

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



(11) **EP 1 048 732 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
02.11.2000 Patentblatt 2000/44

(51) Int Cl.7: **C12N 15/58, C12N 15/62, C12N 15/31, C12N 9/72, C07K 14/245, C07K 1/113, C12N 1/20, C12N 15/70, C12P 21/02**

(21) Anmeldenummer: 99107412.1

(22) Anmeldetag: 26.04.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(72) Erfinder: **Die Erfindernennung liegt noch nicht vor**

(74) Vertreter: **Schreiner, Siegfried, Dr. et al Roche Diagnostics GmbH, Patent Department Pharma (TR-E), P.O. Box 1152 82372 Penzberg (DE)**

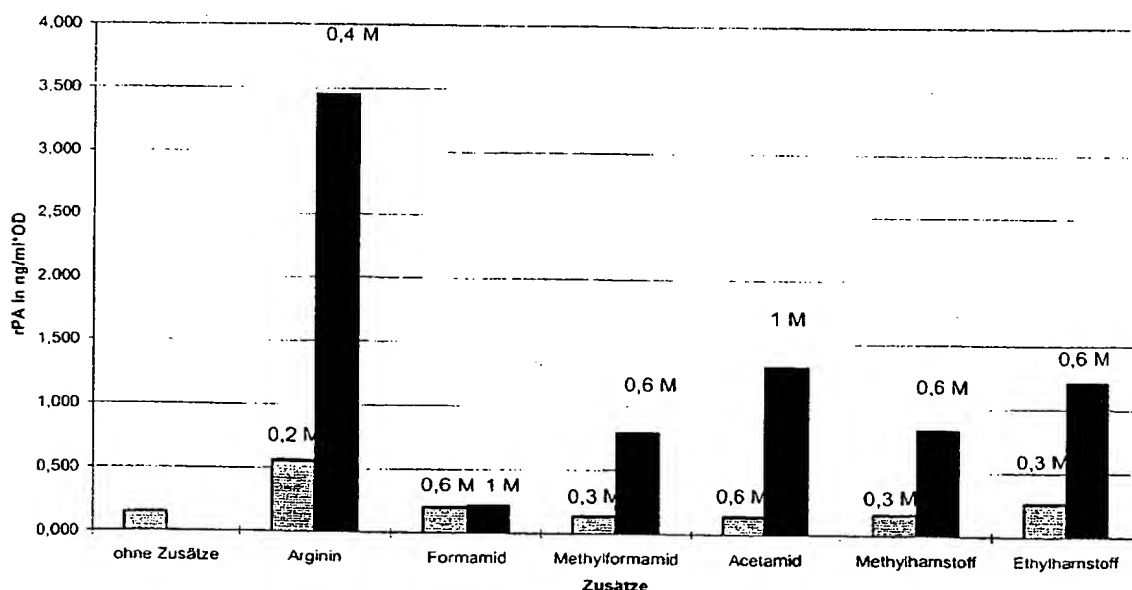
(71) Anmelder: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG 4070 Basel (CH)**

(54) **Verfahren zur Herstellung von natürlich gefalteten und sekretierten Proteinen**

(57) Ein Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen, natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptids, enthaltend zwei oder mehrere über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine, durch Kultivierung prokaryontischer Zellen, a) wobei die genannten prokaryontischen Zellen einen Expressionsvektor enthalten, der für das genannte Polypeptid, das am N-Terminus eine prokaryontische Signalsequenz enthält, codiert, b) unter Bedingungen, bei denen das Polypeptid in das Periplasma oder das Medium sekretiert wird, c) Abspaltung der Si-

gnalsequenz und Isolierung des Polypeptids aus dem Periplasma oder dem Medium, dadurch gekennzeichnet, daß die Kultivierung in Gegenwart von Arginin oder einer Verbindung der allgemeinen Formel I $R_2\text{-CO-NRR}_1$ (I) erfolgt, wobei R und R_1 Wasserstoff oder eine gesättigte oder ungesättigte verzweigte oder unverzweigte $C_1 - C_4$ -Alkylkette und R_2 Wasserstoff, NHR_1 oder eine gesättigte oder ungesättigte verzweigte oder unverzweigte $C_1 - C_3$ -Alkylkette darstellen, ist zur rekombinanten Herstellung von Polypeptiden in Prokaryonten mit hoher Ausbeute geeignet.

Fig. 2



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen, natürlich gefalteten und sekretierten Polypeptiden nach Expression in prokaryontischen Zellen.

[0002] In prokaryontischen Organismen findet die Proteinsynthese, auch Translation genannt, an den Ribosomen im Cytoplasma statt. Bei einer Expression rekombinanter DNA in prokaryontischen Wirtsorganismen ist es oft wünschenswert, daß das dabei erhaltene rekombinante Genprodukt bzw. Protein aus dem Cytoplasma durch die innere bakterielle Membran in den periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Membran sekretiert wird. Vom Periplasma können sekretierte Proteine dann z.B. durch einen osmotischen Schock in das Nährmedium freigesetzt werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die sezernierten Polypeptide häufig nicht die native, biologisch aktive Konformation ausbilden (Hockney, TIBTECH 12 (1994) 456 - 463).

[0003] In jüngster Zeit wurden molekulare Chaperone und Faltungskatalysatoren, wie Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen oder Proteindisulfidisomerasen (Glockshuber et al., EP-A 0 510 658) eingesetzt, um die Ausbeute an nativem rekombinanten Protein bei der Faltung in vivo zu erhöhen (Thomas et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 66 (1997) 197-238). Dies führte teilweise zu erheblichen Verbesserungen bei der Expression z.B. von Ribulosebisphosphat-Carboxylase (RUBISCO; Goloubinoff et al., Nature 337 (1989) 44-47), humaner Procollagenase (Lee & Olins, J. Biol. Chem. 267 (1992) 2849-2852) oder neuronaler Stickstoffoxidsynthase aus Ratten (Roman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 8428-8432). In diesen Beispielen wurden GroEL/ES bzw. das DnaK-System aus E. coli im Cytosol co-überexprimiert. Der positive Effekt liegt dabei meist in einer erhöhten Anreicherung des gewünschten Proteins in löslicher Form.

[0004] Auch bei der Sekretion rekombinanter Proteine ins Periplasma von E. coli wurde die Co-Expression von Chaperone untersucht. Hier wurde jedoch nur eine cytosolische Überexpression von Chaperone erprobt, um die Sekretion ins Periplasma zu optimieren (Perez-Perez et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995) 524-529; Sato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 258-264; Berges et al., Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 55-60). Bisherige Versuche zur Co-Sekretion in E. coli betrafen nur Faltungshelfer-Proteine, wie z. B. Proteindisulfidisomerase (PDI; Glockshuber et al., EP-A 0 510 658) oder Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen oder Dsb-Proteine (Knappik et al., Bio/Technology 11 (1993) 77-83; Qiu et al., Appl. Environm. Microbiol. 64 (1998) 4891-4896 und Schmidt et al., Prot. Engin. 11 (1998) 601 - 607).

[0005] Verbindungen wie Harnstoff oder Harnstoffderivate, Formamid, Acetamid oder L-Arginin werden bei Verfahren zur in vitro Renaturierung von unlöslichen Proteinaggregaten (Inclusion bodies - Einschlußkörper) eingesetzt, die bei der cytoplasmatischen Expression von rekombinanter DNA in prokaryontischen Zellen entstehen. L-Arginin kann als Zusatz bei der Renaturierung in vitro die Ausbeute an nativ gefalteten Proteinen erheblich verbessern (Rudolph et al., US-Patent Nr. 5,593,865; Buchner & Rudolph, Bio/Technology 9 (1991) 157-162; Brinkmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 3075-3079; Lin & Traugh, Prot. Express. Purif. 4 (1993) 256-264).

[0006] Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen, natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptiden nach Expression in Prokaryonten zur Verfügung zu stellen, welches auf einfache Weise durchführbar ist und bei dem eine aufwendige in vitro-Nachbehandlung, wie Auflösung von inclusion bodies, Reduktion und Naturierung, nicht erforderlich ist.

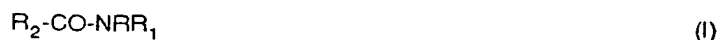
[0007] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen, natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptids, enthaltend zwei oder mehrere über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine, durch Kultivierung prokaryontischer Zellen,

a) wobei die genannten prokaryontischen Zellen einen Expressionsvektor enthalten, der für das genannte Polypeptid, das am N-Terminus eine prokaryontische Signalsequenz enthält, codiert

b) unter Bedingungen, bei denen das Polypeptid in das Periplasma oder das Medium sekretiert wird,

c) Abspaltung der Signalsequenz und Isolierung des Polypeptids aus dem Periplasma oder dem Medium,

dadurch gekennzeichnet, daß die Kultivierung in Gegenwart von Arginin oder einer Verbindung der allgemeinen Formel



erfolgt, wobei

R und R₁ Wasserstoff oder eine gesättigte oder ungesättigte verzweigte oder unverzweigte C₁-C₄-Alkylkette und

R₂ Wasserstoff, NHR₁ oder eine gesättigte oder ungesättigte verzweigte oder unverzweigte C₁-C₃-Alkylkette darstellen.

[0008] Vorzugsweise beträgt die Konzentration von Arginin oder der Verbindung der allgemeinen Formel I mindestens 0,1 mol/l, kann aber auch deutlich höher sein, solange die Löslichkeit von Arginin oder der genannten Verbindung gewährleistet ist. Bevorzugt werden Arginin oder die Verbindungen der allgemeinen Formel I in einer Konzentration von 0,1 bis 1,5 mol/l verwendet.

[0009] Als Verbindungen der allgemeinen Formel I werden vorzugsweise Formamid, Acetamid, Harnstoff oder Harnstoffderivate, wie Ethylharnstoff oder Methylharnstoff zum Nährmedium, welches für die Kultivierung der prokaryontischen Zellen verwendet wird, zugesetzt. Arginin kann beispielsweise als Hydrochlorid oder als andere titrierte Form der Base Arginin verwendet werden. Vorzugsweise wird jedoch L-Arginin, besonders bevorzugt die Hydrochloridform von L-Arginin, verwendet.

[0010] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden dem zur Kultivierung der prokaryontischen Zellen verwendeten Nährmedium (Fermentationsmedium) zusätzlich reduzierende Thiolreagenzien, welche SH-Gruppen enthalten, zugesetzt, wobei die Ausbeute an rekombinant gewonnenem Protein weiter erhöht wird. Vorzugsweise werden 0,1-15 mmol/l Thiolreagenz zugesetzt. Erfindungsgemäß ist unter dem Begriff "Thiolreagenz" entweder ein reduzierendes (reduziertes) Thiolreagenz mit SH-Gruppen oder ein Gemisch von reduzierenden Thiolreagenzien mit SH-Gruppen und oxidierenden Thiolreagenzien mit Disulfidgruppen zu verstehen. Bevorzugte Substanzen sind reduziertes Glutathion (GSH), Cystein, N-Acetylcystein, Cysteamin, β -Mercaptoethanol und ähnliche Verbindungen. Die Thiolreagenzien können sowohl einzeln als auch in Gemischen verwendet werden. Besonders geeignet sind Thiolreagenzien wie beispielsweise Glutathion (GSH), die eine einzige SH-Gruppe pro Molekül aufweisen. Thiolreagenzien wie Glutathion, sind für die Verbesserung der Ausbeute nativ gefalteter Proteine bei der Expression rekombinanter DNA in prokaryontischen Zellen bekannt (Glockshuber et al., EP-A 0 510 658).

[0011] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zusätzlich molekulare Chaperone überexprimiert und cosekretiert. Unter Chaperonen gemäß der Erfindung sind Proteine zu verstehen, die andere, nicht-native Proteine in vivo vor Aggregation schützen und die Ausbildung ihrer nativen Konformation fördern. Molekulare Chaperone werden im Stand der Technik eingesetzt, um Proteine zu stabilisieren und damit vor Aggregation und Inaktivierung zu schützen (Buchner et al., EP-A 0 556 726 A1). Vorzugsweise werden ATP-unabhängige Chaperone des HSP40-Typs (Molmasse ca. 40 kDa) oder ein kleines Hitzeschockprotein (sHSP) verwendet. DnaJ ist ein 40 kDa Hitzeschockprotein, das im Cytoplasma von E. coli vorkommt und Teil des sogenannten Hsp70-Chaperonsystems ist (Bukau, B. & Horwich, A., Cell 92 (1998) 351-366). Zu diesem System gehören außerdem DnaK (Hsp70) und GrpE. Bestimmte Proteine werden durch das DnaK-System in einem ATP-abhängigen Prozeß zur nativen Konformation gefaltet (Schröder et al., EMBO J. 12 (1993) 4137-4144; Langer et al., Nature 356 (1992) 683-689). Zur Rückfaltung denaturierter Proteine benötigt dieses System zusätzlich ATP. DnaJ schützt in Abwesenheit von DnaK und ATP nicht-native Proteine vor Aggregation und vermittelt einen Faltungs-kompetenten Zustand (Schröder et al., EMBO J. 12 (1993) 4137-4144). Weiterhin bevorzugt ist die Co-Sekretion eines N-terminalen Fragmentes von DnaJ, das die Aminosäuren 1-108 umfaßt und im Folgenden als "J-Domäne" (Kelley, TIBS 23 (1998) 222-227) bezeichnet wird. In diesem Bereich befinden sich die J-Domäne und eine G/F-reiche Domäne, die Wechselwirkungen mit DnaK ausüben (Wall et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 2139-2144). Es wurde gezeigt, daß die Co-Expression von DnaJ im Cytosol zur Erhöhung der Ausbeute an löslichem Protein führen kann (Yokoyama et al., Microbiol. Ferment. Technol. 62 (1998) 1205-1210).

[0012] Hsp25 (z.B. aus der Maus) ist ein Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine (Gaestel et al., Eur. J. Biochem. 179 (1989) 209-213), einer Klasse von Chaperonen, die ubiquitär verbreitet ist. Die Molmasse dieser Proteine liegt zwischen 15 und 30 kDa. Bei Hitzeschock werden die sHsps in der Zelle stark angereichert (bis zu 1% des Gesamtzellproteins - Arrigo & Landry (1994), In Morimoto (Hrsg.): The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbour Press, 335-373). Wie DnaJ-Proteine besitzen sHsps die Eigenschaft, die Aggregation von nichtnativen Proteinen zu verhindern und diese in einem faltungskompetenten Zustand zu halten (Jakob et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 1517-1520; Ehrspenger et al., EMBO J. 16 (1997) 221-229).

[0013] Der Begriff "Überexpression" gemäß vorliegender Erfindung bedeutet eine Steigerung der Expression der sekretierten Proteine wie z.B. DnaJ- und Hsp25 (vorzugsweise um mindestens 100%) im Vergleich zur Expression im Wildtyp des jeweils verwendeten prokaryontischen Wirtsorganismus. Eine solche Überexpression läßt sich z.B. dadurch erreichen, daß sich die Gene (für das Protein, Chaperon und/oder Signalpeptid) unter Kontrolle eines starken prokaryontischen, vorzugsweise induzierbaren Expressionssignals (z.B. eines lac- oder T7-Promotors oder eines Derivates davon) befinden.

[0014] Das Sekretionskonstrukt für die Überexpression der Polypeptide (Proteine) samt regulatorischer Regionen (Promotor und Terminator) auf der rekombinanten DNA ist vorzugsweise in einen Vektor, welcher zusätzlich die in

Prokaryonten seltene Arginin-tRNA^{AGA/AGG} codiert integriert oder wird mit einem Vektor, welcher diese tRNA codiert, co-exprimiert (Brinkmann et al., Gene 85 (1989) 109-114). Dies ermöglicht sowohl die Co-Überexpression der jeweiligen Proteine ins bakterielle Periplasma als auch die Transkription der seltenen tRNA^{Arg}_{AGA/AGG}, was eine erhöhte Synthese des gewünschten Proteins im bakteriellen Wirtsorganismus zur Folge hat.

[0015] Unter einer prokaryontischen Signalsequenz im Sinne der Erfindung ist ein Nukleinsäurefragment zu verstehen, welches aus Prokaryonten, vorzugsweise aus gramnegativen Bakterien, abgeleitet ist und das Durchdringen von an das Signalpeptid gebundenen Proteinen durch die inneren bakteriellen Membranen gewährleistet. Dadurch werden die Proteine im Periplasma bzw. im Zellüberstand lokalisiert. Solche Signalsequenzen haben üblicherweise eine Länge von 18 - 30 Aminosäuren und sind beispielsweise beschrieben in Murphy & Beckwith: Export of Proteins to the Cell Envelope in *Escherichia coli* und in Neidhardt et al. (Hrsg.): *Escherichia coli* and *Salmonella*, Second Edition, Vol. 1, ASM Press, Washington, 1996, S. 967-978. Die Abspaltung von bakteriellen Signalsequenzen kann z.B. nach einer Sequenz Ala-X-Ala stattfinden (von Heijne et al., J. Mol. Biol. 184 (1985) 99-105). Die Struktur der bakteriellen Signalpeptidase ist beschrieben in Paetzel et al., Nature 396 (1998) 186-190. Vorzugweise werden Signalsequenzen verwendet, welche durch im Periplasma von prokaryontischen Zellen lokalisierten Proteasen vom gewünschten Protein wieder abgespalten werden. Alternativ kann durch Zugabe solcher Proteasen zum Zellüberstand oder zum isolierten Protein die Abspaltung der Signalsequenz erfolgen.

[0016] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die heterologe Expression einer Vielzahl von eukaryontischen Proteinen wie z.B. Proteasen, Interferone, Protein hormone, Antikörper oder Fragmenten davon verbessert werden. Besonders geeignet ist das Verfahren für die heterologe Herstellung von Proteinen, die im nativen Zustand mindestens zwei über eine Disulfidbrücke verknüpfte Cysteine enthalten und dann, wenn sie N-terminal keine fusionierte prokaryontische Signalsequenz besitzen, bei der prokaryontischen Expression als unlösliche inclusion bodies entstehen. Besonders geeignet ist das Verfahren für Proteine, die mehr als 5 Disulfidbrücken in nativem Zustand enthalten. Ein solches Protein ist beispielsweise ein rekombinanter Plasminogenaktivator (im folgenden rPA genannt, Martin et al., Cardiovasc. Drug Rev. 11 (1993) 299-311, US-Patent Nr. 5,223,256). rPA besitzt 9 Disulfidbrücken, die im reduzierenden Cytosol von *E. coli* nicht ausgebildet werden.

[0017] Dabei wird die periplasmatische Lokalisation des Proteins, und gegebenenfalls des Chaperons, durch "operative Verknüpfung" mit einem Signalpeptid zum Durchdringen innerer bakterieller Membranen gewährleistet.

[0018] Bei der Expression eines solchen Plasminogenaktivators stellte sich eine Konzentration von 0,4 mol/l L-Arginin und 5 mmol/l Glutathion (bei Co-Sekretion von DnaJ, J-Domäne, Hsp25 sowie ScFv) bzw. 0,4 mol/l L-Arginin ohne Glutathion (ohne Co-Sekretion von DnaJ) als optimal heraus.

[0019] Zur Gewinnung des sekretorischen rPA-Proteins in funktionaler Form in *E. coli* wurde das Gen für dieses Protein aus dem Plasmid pA27fd7 (Kohnert et al., Protein Engineering 5 (1992) 93-100) mit gentechnologischen Mitteln an eine prokaryontische Signalsequenz gramnegativer Bakterien, beispielsweise an die Signalsequenz von Pectatlyase B (PelB) von *Erwinia amylovora*, fusioniert. Die Genfusion wurde durch Klonierung in den Vektor pET20b(+) (Novagen Inc., Madison, USA) hergestellt. Damit unterliegt die Genexpression der Kontrolle des T7-Promotors. Die im Fusionsprotein vorhandene Signalsequenz bewirkt die Sekretion ins Periplasma. Während oder nach der Sekretion wird die Signalsequenz durch eine in der inneren Membran lokalisierte Peptidase abgespalten. Sezerniertes Protein kann dann im Periplasma fallen. Die oxidierenden Bedingungen dieses Kompartiments ermöglichen die Ausbildung von Disulfidbrücken. Durch den erfindungsgemäßen Zusatz von niedermolekularen faltungsverbessernden Proteinen und Thiolagenzien im Nährmedium und gleichzeitiger Co-Überexpression von DnaJ, J-Domäne oder Hsp25 im Periplasma gelingt es, die Ausbeute an funktionalem Protein um mehr als das 100-fache zu steigern.

[0020] Weitere Beispiele von erfindungsgemäßen Polypeptiden sind Antikörper oder Antikörperfragmente, beispielsweise ein Single-Chain F_v-Fragment (ScF_v, z.B. gegen das Schilddrüsenstimulierende Hormon (thyroide stimulating hormone, TSH). ScFvs sind verkürzte Antikörper, die nur aus den variablen Abschnitten (F_v) der schweren und leichten Kette eines Antikörpers bestehen, die über einen kurzen (meist Gly₄Ser₃) Linker künstlich fusioniert sind (Hudson, Curr. Opin Biotechnol. 9 (1998) 395-402). ScFvs haben normalerweise die gleiche Affinität zum Antigen wie die paternalen Fv-Stränge, können jedoch in *E. coli* überexprimiert werden. Da sie stabilisierende Intradomänen-Disulfidbrücken besitzen, die essentiell für die Stabilität sind, führt eine Expression im Cytosol meist zur Bildung von Inclusion Bodies (Übersichtsartikel: Shibui et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 (1992) 352-357). ScFvs können durch Zufallsmutationen und anschließende Phage-Display-Selektion auf Bindung gewünschter Antigene gezielt optimiert werden (Übersichtsartikel: Allen et al., TIBS 20 (1995) 511-516). Durch Zugabe von 5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin konnte die Ausbeute an funktionellem ScFv-TSH im Periplasma um das 10-fache und im Medienüberstand um das 40-fache gegenüber einer Kultivierung ohne Zusätze verbessert werden.

[0021] Die folgenden Beispiele, Publikationen, das Sequenzprotokoll und die Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beschreibung des Sequenzprotokolls

[0022] SEQ ID NO: 1 und 2 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-dnaJ, der für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz und DnaJ codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pIN III ompA3-dnaJ amplifiziert wurden.

[0023] SEQ ID NO: 3 und 4 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-J-Domain, der für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz und J-Domäne codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pIN III ompA3-dnaJ amplifiziert wurden.

[0024] SEQ ID NO: 5 und 6 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-hsp25, der für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz und Hsp25 codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pIN III ompA3-hsp25 amplifiziert wurden.

[0025] SEQ ID NO: 7 und 8 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-ScFvOx, der für das Fusionsprotein aus PelB-Signalsequenz und ScFvOxazon codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pHEN-ScFv bzw. pIN III ompA3 amplifiziert wurden.

[0026] SEQ ID NO: 9 und 10 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pET20b(+)-rPA, der für das Fusionsprotein aus PelB-Signalsequenz und rPA codiert.

Beschreibung der Figuren

[0027] Fig. 1 zeigt die Abhängigkeit der Expression von nativem rPA im Periplasma von *E. coli* bei 5 mM GSH in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration und verschiedener Co-Sekretionskonstrukte.

[0028] Fig. 2 zeigt einen Vergleich der Expression von rPA im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3) bei Co-Sekretion von DnaJ und bei Zusatz von GSH und verschiedenen niedermolekularen faltungsverbessernden Stoffen zum Medium.

[0029] Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-dnaJ.

[0030] Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-J-Domain.

[0031] Fig. 5 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-hsp25.

[0032] Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-ScFvOx.

[0033] Fig. 7 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pET20b(+)-rPA.

[0034] Fig. 8 zeigt die Abhängigkeit der Expression von funktionellem ScFv-TSH von der Konzentration von L-Arginin und GSH im Kulturmedium.

[0035] (Werte wurden als relative Mengen bezüglich der Probe ohne Medienzusätze (:1) berechnet.)

[0036] Fig. 9 zeigt die Abhängigkeit der Expression von funktionellem ScFv-TSH von der Konzentration von L-Arginin und GSH im Periplasma von *E. coli*.

[0037] (Werte wurden als relative Mengen bezüglich der Probe ohne Medienzusätze (:1) berechnet.)

Allgemeines:

[0038] Zur periplasmatischen Überexpression von DnaJ, der J-Domäne sowie Hsp25 in *E. coli* wurde die DNA, die für diese Proteine codiert, mit gentechnologischen Mitteln an die Signalsequenz des Outer Membrane Proteins A (OmpA) von *E. coli* fusioniert und die Fusion auf einem rekombinanten Plasmid unter Kontrolle des lac-lpp-Promotors in *E. coli* exprimiert. Somit werden die Polypeptidkette von DnaJ und Hsp25 ins Periplasma des prokaryontischen Wirtsorganismus transportiert und dort nativ gefaltet. Die Lokalisation und native Faltung konnte dabei durch limitierte Proteolyse mit Trypsin und Western Blot nachgewiesen werden.

Beispiel 1:**Konstruktion des Expressionsplasmides pIN III omp A3-dnaJ**

[0039] Molekulargenetische Techniken beruhen auf Ausubel et al. (Hrsg.), J. Wiley & Sons, 1997, Curr. Protocols of Molecular Biology. Oligonucleotide wurden von den Firmen MWG Biotech, Ebersberg oder GIBCO Life Sciences, Eggenstein, DE bezogen.

[0040] Das Gen, das für DnaJ codiert, Gene Bank Accession No. M 12565, wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in das Expressionsplasmid pIN III ompA3 (Ghayre et al., EMBO J. 3 (1984) 2437-2442) kloniert. Die Sequenz des klonierten PCR-Fragments wurde durch Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg) überprüft. Das resultierende Plasmid wurde pIN III ompA3-dnaJ bezeichnet. Die Sequenz des periplasmatisch exprimierten DnaJ unterscheidet sich von dem Wildtyp-Protein dahingehend, daß die Polypeptidsequenz mit Gly-Ile-Pro beginnt statt mit Met, es fand somit eine Verlängerung des N-Terminus um 2 Aminosäuren statt. DnaJ befindet sich damit unter Kontrolle des lac-lpp-Promotors, der mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid)

induziert wird.

Beispiel 2:

Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-dnaJ

[0041] Mittels PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pIN III ompA3-dnaJ amplifiziert, der für das lac-lpp Operon, die Signalsequenz, das dnaJ-Gen und die Terminator-Region des Operons codiert (SEQ ID NO: 1). Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuclease BglII geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuclease BamHI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pUBS520-pIN-dnaJ bezeichnet (Fig. 3).

Beispiel 3:

Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS 520-pIN-J-Domain

[0042] Mittels des QuikChange-Mutagenese-Systems (Promega, Mannheim, DE) wurden im Plasmid pUBS 520-pIN-dnaJ nach dem Nucleotid 324 zwei Stop-Codone eingefügt, so daß nur noch die ersten 108 Aminosäuren exprimiert werden. Die Sequenz des mutagenisierten Bereiches wurde durch Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg) und die Expression des verkürzten Proteinfragments durch Western Blotting und Detektion mit einem Anti-DnaJ-Antikörper nachgewiesen. Das entstandene Plasmid wurde mit pUBS 520-pIN-J-Domain (Fig. 4) bezeichnet.

Beispiel 4:

Konstruktion des Expressionsplasmides pIN III ompA3-hsp25

[0043] Das Gen, das für Hsp25 codiert, Gene Bank Accession No.: L 07577, wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in das Expressionsplasmid pIN III ompA3 (Ghayreb *et al.*, EMBO J. 3 (1984) 2437-2442) kloniert. Die Sequenz des klonierten PCR-Fragments wurde durch Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg) überprüft. Das resultierende Plasmid wurde pIN III ompA3-hsp25 bezeichnet. Die Sequenz des periplasmatisch exprimierten Hsp25 unterscheidet sich von dem Wildtyp-Protein dahingehend, daß die Polypeptidsequenz mit Gly-Ile-Leu beginnt statt mit Met, es fand somit eine Verlängerung des N-Terminus um 2 Aminosäuren statt. Hsp25 befindet sich damit unter Kontrolle des lac-lpp-Promotors, der mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid) induziert wird.

Beispiel 5:

Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-hsp25

[0044] Mittels PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pIN III ompA3-hsp25 amplifiziert, der für das lac-lpp Operon, die Signalsequenz, das hsp25-Gen und die Terminator-Region des Operons codiert (SEQ ID NO: 5). Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuclease BglII geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuclease BamHI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pUBS520-pIN-hsp25 bezeichnet (Fig. 5).

Beispiel 6:

Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS520-ScFvOx

[0045] Als negativ-Kontrolle wurde die Co-Expression eines Single-Chain-Fv-Fragmentes, das gegen das Hapten Oxazolone gerichtet ist (ScFvOxazolone; Fiedler und Conrad, Bio/Technology 13 (1995) 1090-1093 untersucht, das keine Chaperon-Eigenschaften besitzt.

[0046] Mittels PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pHEN-ScFvOx amplifiziert, der für den lac-Promotor, die Signalsequenz pelB und das scfvOx-Gen codiert. In einer zweiten PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pIN III ompA3 amplifiziert, der für den lpp-Terminator codiert. In einer anschließenden PCR wurden die beiden Fragmente fusioniert. Das so entstandene PCR-Produkt (SEQ ID NO: 7) wurde mit der Restriktionsendonuclease BglII geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuclease BamHI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pUBS520-ScFvOx bezeichnet (Fig. 6).

Beispiel 7:**Konstruktion des Expressionsplasmides pET20b(+)-rPA**

[0047] Mit Hilfe der PCR-Methode wurde das Gen eines Plasminogenaktivators (rPA) aus dem Plasmidvektor pA27fd7 (Kohnert et al., Protein Engineering 5 (1992) 93-100) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonucleasen NcoI und BamHI gespalten und in den Plasmidvektor pET20b(+) (Novagen Inc., Madison, USA) kloniert. Das Plasmid codiert für ein Fusionsprotein, welches aus der Signalsequenz von PelB (Pectatlyase aus *Erwinia amylovora*) und rPA besteht und die Sekretion von rPA ins Periplasma Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg, DE) überprüft. Das Konstrukt wurde als pET20b(+)-rPA bezeichnet (Fig. 7). In dem Plasmid wird rPA unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert, wobei die T7-RNA-Polymerase im Stamm *E. coli* BL21(DE3) der Kontrolle des lacUV5-Promotors unterliegt. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG. Das periplasmatisch exprimierte rPA unterscheidet sich von dem bei Kohnert et al. beschriebenen Plasminogenaktivator durch Austausch der zweiten Aminosäure (Ser) gegen Ala.

Beispiel 8:**Funktionale Expression von rPA im Periplasma von *E. coli* unter Verwendung der Medienzusätze Glutathion und L-Arginin**

[0048] Eine stationäre Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) (Studier & Moffat, J. Mol. Biol. 189 (1986) 113-130), die mit pET20b(+)-rPA und pUBS520-pIN-dnaJ transformiert wurde (Co-Expression von DnaJ), eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+)-rPA und pUBS520-pIN-J-Domain transformiert wurde (Co-Expression der J-Domäne), eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+)-rPA und pUBS520-pIN-hsp25 transformiert wurde (Co-Expression von Hsp25), eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+)-rPA und pUBS520-ScFvOx transformiert wurde (Co-Expression von ScFvOx), eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+)-rPA und pUBS520 transformiert wurde bzw. eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+) und pUBS520 transformiert wurde (Kontrollkultur), wurde im Verhältnis 1:50 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml, Fluka Chemica, Neu-Ulm, DE) verdünnt und bei 24°C und 170 rpm geschüttelt. Nach 3 h Wachstum wurden je 5 ml der Kultur zu je 10 ml LB-Medium mit o.g. Mengen an Ampicillin und Kanamycin und verschiedenen Konzentrationen von GSH (0-10 mM, Fluka, DE) und L-Arginin HCl (0-0,4 M, ICN) gegeben und mit jeweils 1mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid, AppliChem, Darmstadt, DE) induziert. Die Zellen wurden weitere 21 h bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt und nach Bestimmung der OD₆₀₀ eine 1 ml-Probe genommen. Diese 1ml-Zellproben wurden nach einer modifizierten Vorschrift nach Jacobi et al. (J. Biol. Chem. 272 (1997) 21692-21699) in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen fraktioniert. Im Detail wurde das Zellpellet mit 500 µl Fraktionierungspuffer (150 mM NaCl (Roth GmbH), 50 mM Tris/HCl (Roth GmbH, 5mM EDTA (Biomol) und 1 mg/ml Polymyxin-B-Sulfat (Sigma), pH 7,5) versetzt, 1 h bei 10 °C auf einem Eppendorf-Thermoschüttler bei 1400 rpm geschüttelt und dann 15 min bei 14 000 rpm in einer auf 10°C gekühlten Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert, so daß eine Fraktion mit den löslichen periplasmatischen Proteinen (Überstand) und eine Restfraktion (Pellet) entstand.

[0049] Die Bestimmung von der Aktivität von rPA erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Verheijen et al. Thromb. Haemostasis 48 (1982) 266-269.

[0050] Alle ermittelten rPA-Konzentrationen in den Zellextrakten wurden auf Zellsuspensionen von OD₆₀₀=1 normiert, um den Fehler, der bei der Messung in verschiedenen Puffern auftritt, zu korrigieren.

Beispiel 9:**Funktionale Expression von rPA im Periplasma von *E. coli* unter Verwendung von Gemischen aus Glutathion mit Formamid, Methylformamid, Acetamid, Methylharnstoff sowie Ethylharnstoff als Medienzusätze**

[0051] Eine stationäre Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+)-rPA und pUBS520-pIN-dnaJ transformiert wurde (Co-Expression von DnaJ), wurde wie in Beispiel 8 angegeben kultiviert. Zusätzlich wurden Verbindungen der Formel I und jeweils 5 mM Glutathion dem Kulturmedium zugesetzt. Eine Kontrollkultur wurde in LB ohne Zusätze kultiviert. Die Verbindungen der Formel I und ihre eingesetzte Konzentration sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Probenaufbereitung, Periplasmafraktionierung und der Enzymtest auf tPA-Aktivität wurden wie in Beispiel 8 ausgeführt.

[0052] Die Ergebnisse zur rPA Expression zeigen die Tabellen 1 und 2 sowie die Figuren 1 und 2.

Tabelle 1:

Effekt von L-Arginin im Fermentationsmedium auf die Ausbildung von nativem rPA im Periplasma						
Co-sekretiertes Protein	0 M L-Arginin		0,2 M L-Arginin		0,4 M L-Arginin	
	rPA in ng/ml*OD ₆₀₀	Stimulationfaktor	rPA in ng/ml*OD ₆₀₀	Stimulationfaktor	rPA in ng/ml*OD ₆₀₀	Stimulationfaktor
.	0,030 ± 0,001	29	0,044 ± 0,090	20	0,170 ± 0,005	23
DnaJ	0,197 ± 0,019	29	0,730 ± 0,150	27	3,978 ± 1,000	18
J-Domäne	0,339 ± 0,007	16	0,625 ± 0,213	17	4,398 ± 0,165	15
Hsp25	0,053 ± 0,002	27	0,140 ± 0,001	17	2,850 ± 0,214	17
ScFvOxazon	0,041 ± 0,003	13	0,144 ± 0,047	8	0,713 ± 0,113	10

[0053] Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von 5 mM GSH.

Tabelle 2:

Expression von nativem rPA im Periplasma von E. coli bei Co-Sekretion von DnaJ und Zusatz verschiedener niedermolekularer faltungsverbessernder Zusätze					
Zusatz	Konzentration im Kulturmedium	Menge rPA in ng/ml*OD ₆₀₀ im Periplasma	Stimulationsfaktor	OD ₆₀₀ bei Zellernte	Konzentration GSH im Medium
ohne Zusätze	-	0,153	24	4,52	0 mM
Arginin	0,2 M	0,560	21	4,45	5 mM
	0,4 M	3,880	17	1,73	5 mM
Formamid	0,6 M	0,208	17	4,96	5 mM
	1,0 M	0,219	10	4,71	5 mM
Methylformamid	0,3 M	0,141	15	4,57	5 mM
	0,6 M	0,790	17	1,04	5 mM
Acetamid	0,6 M	0,150	24	5,34	5 mM
	1,0 M	1,321	16	1,57	5 mM
Methylharnstoff	0,3 M	0,168	24	4,67	5 mM
	0,6 M	0,830	22	4,59	5 mM
Ethylharnstoff	0,3 M	0,266	23	4,20	5 mM
	0,6 M	1,209	17	0,82	5 mM

Beispiel 10:

Expression eines funktionellen Single-Chain-Fv-Fragmentes unter Zusatz von reduziertem Glutathion und L-Arginin zum Kulturmedium

[0054] Eine stationäre Übernachtskultur von E. coli BL21(DE3), die mit einem Plasmid, welches für ein Single-chain-Fv-Fragment eines anti-TSH Antikörpers codiert und pUBS520 transformiert wurde, wurde im Verhältnis 1:50 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml, Fluka Chemica, Neu-Ulm) verdünnt und bei 24°C und 170 rpm geschüttelt. Nach 3 h Wachstum wurden je 5 ml der Kultur zu je 10 ml LB-Medium mit o.g. Mengen an Ampicillin und Kanamycin und verschiedenen Konzentrationen von GSH (0-10 mM, Fluka) und L-Arginin HCl (0-0,4 M, ICN) gegeben und mit jeweils 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid, AppliChem, Darmstadt) induziert. Die Zellen wurden weitere 21 h bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt und nach Bestimmung der OD₆₀₀ eine 1 ml-Probe genommen. Diese 1 ml-Zellproben wurden nach einer modifizierten Vorschrift nach Jacobi et al. (J. Biol. Chem. 272 (1997) 21692-21699) in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen fraktioniert (s. Beispiel 8). Weiterhin wurde eine Probe des Medienüberstandes (1 ml) genommen. Zur Analyse der Proben auf funktionellen Antikörpern wurden sie einem ELISA-Test unterzogen.

[0055] Der Zusatz von L-Arginin und GSH zum Kulturmedium im Falle der Expression von ScFv-TSH hatte ebenfalls einen positiven Einfluß auf die Ausbeute an nativem ScFv-TSH im Periplasma und im Medium-Überstand von E. coli. Bei Zugabe von 0,4 M L-Arginin und 5 mM GSH konnte die Menge an mittels ELISA detektiertem Antikörperfragment im Medien-Überstand um das 39-fache (Fig. 8) und in der periplasmatischen Fraktion um das 10-fache (Fig. 9) gegenüber einer Kultivierung ohne Medienzusätze gesteigert werden.

Referenzliste

[0056]

Allen et al., TIBS 20 (1995) 511-516

Arrigo & Landry (1994) In Morimoto (Hrsg.): The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbour Press, 335-373

Ausubel et al. (Hrsg.) Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, 1997

Berges et al., Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 55-60

EP 1 048 732 A1

- Brinkmann et al., *Gene* 85 (1989) 109 - 114
 Brinkmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89 (1992) 3075-3079
 Buchner & Rudolph, *Bio/Technology* 9 (1991) 157-162
 Bukau, B. & Horwich, A., *Cell* 92 (1998) 351-366
 5 Ehrspenger et al., *EMBO J.* 16 (1997) 221-229
 EP-A 0 510 658
 EP-A 0 556 726
 Fiedler und Conrad, *Bio/Technology* 13 (1995) 1090 - 1093
 Gaestel et al., *Eur. J. Biochem.* 179 (1989) 209-213
 10 Ghayreb et al., *EMBO J.* 3 (1984) 2437-2442
 Goloubinoff et al., *Nature* 337 (1989) 44-47
 Hockney, *TIBTECH* 12 (1994) 456- 463
 Hudson, *Curr. Opin Biotechnol.* 9 (1998) 395-402
 Jacobi et al. (*J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21692-21699
 15 Jakob et al., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1517-1520
 Kelley, *TIBS* 23 (1998) 222-227
 Knappik et al., *Bio/Technology* 11 (1993) 77-83
 Kohnert et al., *Protein Engineering* 5 (1992) 93-100
 Langer et al., *Nature* 356 (1992) 683 - 689
 20 Lee & Olins, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2849-2852
 Lin & Traugh, *Prot. Express. Purif.* 4 (1993) 256-264).
 Martin et al., *Cardiovasc. Drug Rev.* 11 (1993) 299-311
 Murphy & Beckwith: *Export of Proteins to the Cell Envelope in Escherichia coli*
 Neidhardt et al. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella*, Second Edition, Vol. 1, ASM Press, Washington, 1996,
 25 S. 967-978
 Paetzel et al., *Nature* 396 (1998) 186- 190
 Perez-Perez et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (1995) 524-529
 Qiu et al., *Appl. Environm. Microbiol.* 64 (1998) 4891 - 4896
 Roman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8428-8432
 30 Sato et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 258-264
 Schmidt et al., *Prot. Engin.* 11 (1998) 601- 607
 Schröder et al., *EMBO J.* 12 (1993) 4137-4144
 Shibui et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 (1992) 352 - 357
 Studier & Moffat, *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 113-130
 35 Thomas et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66 (1997) 197-238
 US-Patent Nr. 5,223,256
 US-Patent Nr. 5,593,865
 Verheijen et al. *Thromb. Haemostasis* 48 (1982) 266-269
 Wall et al., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2139-2144
 40 Yokoyama et al., *Microbiol. Ferment. Technol.* 62 (1998) 1205-1210

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Verfahren zur Herstellung von natuerlich gefalteten und sekretierten Proteinen

10 <130> Case 20379

<160> 10

<210> 1

15 <211> 1881

<212> DNA

<213> E. coli

<220>

20 <221> CDS

<222> (392)...(1591)

<400> 1

25 TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTGGATAACC AGAAGCAATA AAAAATCAAA TCGGATTTC 60

CTATATAATC TCACTTTATC TAAGATGAAT CCGATGGAAG CATCCTGTTT TCTCTCAATT 120

TTTTTATCTA AAACCCAGCG TTCGATGCTT CTTTGAGCGA ACGATCAAAA ATAAGTGCCT 180

30 TCCCATCAAA AAAATATTCT CAACATAAAA AACTTTGTGT AATACTTGTA ACGCTACATG 240

GAGATTAACCT CAATCTAGCT AGAGAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATAATGT 300

35 GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT 360

TCACTGGAAC TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG 412

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala

1 5

40 ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGA ATT 460

Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile

10 15 20

45 CCA GCT AAG CAA GAT TAT TAC GAG ATT TTA GGC GTT TCC AAA ACA GCG 508

Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala

25 30 35

50 GAA GAG CGT GAA ATC AGA AAG GCC TAC AAA CGC CTG GCC ATG AAA TAC 556

Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr

40 45 50 55

CAC CCG GAC CGT AAC CAG GGT GAC AAA GAG GCC GAG GCG AAA TTT AAA 604

His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys

60 65 70

55

EP 1 048 732 A1

	GAG	ATC	AAG	GAA	GCT	TAT	GAA	GTT	CTG	ACC	GAC	TCG	CAA	AAA	CGT	GCG	652
	Glu	Ile	Lys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Val	Leu	Thr	Asp	Ser	Gln	Lys	Arg	Ala	
				75					80						85		
5	GCA	TAC	GAT	CAG	TAT	GGT	CAT	GCT	GCG	TTT	GAG	CAA	GGT	GGC	ATG	GGC	700
	Ala	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Gly	His	Ala	Ala	Phe	Glu	Gln	Gly	Gly	Met	Gly	
			90					95					100				
10	GGC	GGC	GGT	TTT	GGC	GSC	GGC	GCA	GAC	TTC	AGC	GAT	ATT	TTT	GGT	GAC	748
	Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Phe	Gly	Asp	
		105					110					115					
15	GTT	TTC	GGC	GAT	ATT	TTT	GGC	GGC	GGA	CGT	GGT	CGT	CAA	CGT	GCG	GCG	796
	Val	Phe	Gly	Asp	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gln	Arg	Ala	Ala	
		120				125					130					135	
20	CGC	GGT	GCT	GAT	TTA	CGC	TAT	AAC	ATG	GAG	CTC	ACC	CTC	GAA	GAA	GCT	844
	Arg	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Tyr	Asn	Met	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ala	
					140					145					150		
25	GTA	CGT	GGC	GTG	ACC	AAA	GAG	ATC	CGC	ATT	CCG	ACT	CTG	GAA	GAG	TGT	892
	Val	Arg	Gly	Val	Thr	Lys	Glu	Ile	Arg	Ile	Pro	Thr	Leu	Glu	Glu	Cys	
				155					160					165			
30	GAC	GTT	TGC	CAC	GGT	AGC	GGT	GCA	AAA	CCA	GGT	ACA	CAG	CCG	CAG	ACT	940
	Asp	Val	Cys	His	Gly	Ser	Gly	Ala	Lys	Pro	Gly	Thr	Gln	Pro	Gln	Thr	
			170					175					180				
35	TGT	CCG	ACC	TGT	CAT	GGT	TCT	GGT	CAG	GTG	CAG	ATG	CGC	CAG	GGA	TTC	988
	Cys	Pro	Thr	Cys	His	Gly	Ser	Gly	Gln	Val	Gln	Met	Arg	Gln	Gly	Phe	
		185					190					195					
40	TTC	GCT	GTA	CAG	CAG	ACC	TGT	CCA	CAC	TGT	CAG	GGC	CGC	GGT	ACG	CTG	1036
	Phe	Ala	Val	Gln	Gln	Thr	Cys	Pro	His	Cys	Gln	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	
		200				205					210					215	
45	ATC	AAA	GAT	CCG	TGC	AAC	AAA	TGT	CAT	GGT	CAT	GGT	CGT	GTT	GAG	CGC	1084
	Ile	Lys	Asp	Pro	Cys	Asn	Lys	Cys	His	Gly	His	Gly	Arg	Val	Glu	Arg	
					220					225					230		
50	AGC	AAA	ACG	CTG	TCC	GTT	AAA	ATC	CCG	GCA	GGG	GTG	GAC	ACT	GGA	GAC	1132
	Ser	Lys	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Asp	
				235					240					245			
55	CGC	ATC	CGT	CTT	GCG	GGC	GAA	GGT	GAA	GCG	GGC	GAG	CAT	GGC	GCA	CCG	1180
	Arg	Ile	Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Gly	Glu	Ala	Gly	Glu	His	Gly	Ala	Pro	
			250					255					260				
60	GCA	GGC	GAT	CTG	TAC	GTT	CAG	GTT	CAG	GTT	AAA	CAG	CAC	CCG	ATT	TTC	1228
	Ala	Gly	Asp	Leu	Tyr	Val											

EP 1 048 732 A1

	ATG GCG GCG CTG GGT GGC GAA ATC GAA GTA CCG ACC CTT GAT GGT CGC	1324
	Met Ala Ala Leu Gly Gly Glu Ile Glu Val Pro Thr Leu Asp Gly Arg	
	300 305 310	
	GTC AAA CTG AAA GTG CCT GGC GAA ACC CAG ACC GGT AAG CTA TTC CGT	1372
	Val Lys Leu Lys Val Pro Gly Glu Thr Gln Thr Gly Lys Leu Phe Arg	
	315 320 325	
	ATG CGC GGT AAA GGC GTC AAG TCT GTC CGC GGT GGC GCA CAG GGT GAT	1420
	Met Arg Gly Lys Gly Val Lys Ser Val Arg Gly Gly Ala Gln Gly Asp	
	330 335 340	
	TTG CTG TGC CGC GTT GTC GTC GAA ACA CCG GTA GGC CTG AAC GAA AGG	1468
	Leu Leu Cys Arg Val Val Val Glu Thr Pro Val Gly Leu Asn Glu Arg	
	345 350 355	
	CAG AAA CAG CTG CTG CAA GAG CTG CAA GAA AGC TTC GGT GGC CCA ACC	1516
	Gln Lys Gln Leu Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ser Phe Gly Gly Pro Thr	
	360 365 370 375	
	GGC GAG CAC AAC AGC CCG CGC TCA AAG AGC TTC TTT GAT GGT GTG AAG	1564
	Gly Glu His Asn Ser Pro Arg Ser Lys Ser Phe Phe Asp Gly Val Lys	
	380 385 390	
	AAG TTT TTT GAC GAC CTG ACC CGC TAA GGATCCGGCT GAGCAACGAC	1611
	Lys Phe Phe Asp Asp Leu Thr Arg *	
	395 400	
50	GTGAACGCAA TGC GTTCCGA CGTTCAGGCT GCTAAAGATG ACGCAGCTCG TGCTAACCAG	1671
	CGTCTGGACA ACATGGCTAC TAAATACCGC AAGTAATAGT ACCTGTGAAG TGAAAAATGG	1731
	CGCACATTGT GCGACATTTT TTTTGTCTGC CGTTTACCGC TACTGCGTCA CGCGTAACAT	1791
35	ATTCCCTTGC TCTGGTTCAC CATCTGCGC TGA CTCTACT GAAGGCGCAT TGCTGGCTGC	1851
	GGGAGTTGCT CCACTGCTCA CCGAAACCGG	1881
40		
	<210> 2	
	<211> 400	
	<212> PRT	
45	<213> E. coli	
	<400> 2	
50	Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala	
	1 5 10 15	
	Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile	
	20 25 30	
55	Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr	
	35 40 45	

EP 1 048 732 A1

	Lys	Arg	Leu	Ala	Met	Lys	Tyr	His	Pro	Asp	Arg	Asn	Gln	Gly	Asp	Lys	
	50						55					60					
5	Glu	Ala	Glu	Ala	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Lys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Val	Leu	
	65					70					75					80	
	Thr	Asp	Ser	Gln	Lys	Arg	Ala	Ala	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Gly	His	Ala	Ala	
					85					90					95		
10	Phe	Glu	Gln	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	
				100				105						110			
	Phe	Ser	Asp	Ile	Phe	Gly	Asp	Val	Phe	Gly	Asp	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	
15			115					120					125				
	Arg	Gly	Arg	Gln	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Tyr	Asn	Met	
		130						135					140				
20	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ala	Val	Arg	Gly	Val	Thr	Lys	Glu	Ile	Arg	
	145					150					155					160	
	Ile	Pro	Thr	Leu	Glu	Glu	Cys	Asp	Val	Cys	His	Gly	Ser	Gly	Ala	Lys	
				165						170					175		
25	Pro	Gly	Thr	Gln	Pro	Gln	Thr	Cys	Pro	Thr	Cys	His	Gly	Ser	Gly	Gln	
				180					185					190			
	Val	Gln	Met	Arg	Gln	Gly	Phe	Phe	Ala	Val	Gln	Gln	Thr	Cys	Pro	His	
30			195					200					205				
	Cys	Gln	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Lys	Asp	Pro	Cys	Asn	Lys	Cys	His	
		210					215					220					
35	Gly	His	Gly	Arg	Val	Glu	Arg	Ser	Lys	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ile	Pro	
	225					230					235				240		
	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Asp	Arg	Ile	Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Gly	Glu	
				245					250					255			
40	Ala	Gly	Glu	His	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Asp	Leu	Tyr	Val	Gln	Val	Gln	
				260					265					270			
	Val	Lys	Gln	His	Pro	Ile	Phe	Glu	Arg	Glu	Gly	Asn	Asn	Leu	Tyr	Cys	
		275					280					285					
45	Glu	Val	Pro	Ile	Asn	Phe	Ala	Met	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	
		290					295					300					
	Val	Pro	Thr	Leu	Asp	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Lys	Val	Pro	Gly	Glu	Thr	
50		305				310					315				320		
	Gln	Thr	Gly	Lys	Leu	Phe	Arg	Met	Arg	Gly	Lys	Gly	Val	Lys	Ser	Val	
				325						330				335			
55	Arg	Gly	Gly	Ala	Gln	Gly	Asp	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Val	Val	Glu	Thr	
				340					345					350			

EP 1 048 732 A1

Pro Val Gly Leu Asn Glu Arg Gln Lys Gln Leu Leu Gln Glu Leu Gln
355 360 365

5
Glu Ser Phe Gly Gly Pro Thr Gly Glu His Asn Ser Pro Arg Ser Lys
370 375 380

10
Ser Phe Phe Asp Gly Val Lys Lys Phe Phe Asp Asp Leu Thr Arg *
385 390 395 400

<210> 3
<211> 1881
15 <212> DNA
<213> E. coli

<220>
<221> CDS
20 <222> (392)...(790)

<400> 3

25
TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTGGATAACC AGAAGCAATA AAAAATCAAA TCGGATTTC 60
CTATATAATC TCACTTTATC TAAGATGAAT CCGATGGAAG CATCCTGTTT TCTCTCAATT 120
TTTTTATCTA AAACCCAGCG TTCGATGCTT CTTTGAGCGA ACGATCAAAA ATAAGTGCCT 180
30 TCCCATCAAA AAAATATTCT CAACATAAAA AACTTTGTGT AATACTTGTA ACGCTACATG 240
GAGATTAACT CAATCTAGCT AGAGAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATAATGT 300
GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT 360
35 TCACTGGAAC TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG 412
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala
1 5

40
ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGA ATT 460
Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile
10 15 20

45
CCA GCT AAG CAA GAT TAT TAC GAG ATT TTA GGC GTT TCC AAA ACA GCG 508
Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala
25 30 35

50
GAA GAG CGT GAA ATC AGA AAG GCC TAC AAA CGC CTG GCC ATG AAA TAC 556
Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr
40 45 50 55

55
CAC CCG GAC CGT AAC CAG GGT GAC AAA GAG GCC GAG GCG AAA TTT AAA 604
His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys
60 65 70

EP 1 048 732 A1

	GAG ATC AAG GAA GCT TAT GAA GTT CTG ACC GAC TCG CAA AAA CGT GCG Glu Ile Lys Glu Ala Tyr Glu Val Leu Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala 75 80 85	652
	GCA TAC GAT CAG TAT GGT CAT GCT GCG TTT GAG CAA GGT GGC ATG GGC Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu Gln Gly Gly Met Gly 90 95 100	700
	GGC GGC GGT TTT GGC GGC GGC GCA GAC TTC AGC GAT ATT TTT GGT GAC Gly Gly Gly Phe Gly Gly Gly Ala Asp Phe Ser Asp Ile Phe Gly Asp 105 110 115	748
	GTT TTC GGC GAT ATT TTT GGC GGC GGA CGT GGT CGT TAA TAG Val Phe Gly Asp Ile Phe Gly Gly Gly Arg Gly Arg * * 120 125 130	790
	GCGGCGCGCG GTGCTGATTT ACGCTATAAC ATGGAGCTCA CCCTCGAAGA AGCTGTACGT	850
	GGCGTGACCA AAGAGATCCG CATTCCGACT CTGGAAGAGT GTGACGTTTG CCACGGTAGC	910
	GGTGCAAAAC CAGGTACACA GCCGCAGACT TGTCCGACCT GTCATGGTTC TGGTCAGGTG	970
	CAGATGCGCC AGGGATTCTT CGCTGTACAG CAGACCTGTC CACACTGTCA GGGCCGCGGT	1030
	ACGCTGATCA AAGATCCGTG CAACAAATGT CATGGTCATG GTCGTGTIGA GCGCAGCAAA	1090
	ACGCTGTCCG TTAAATCCC GGCAGGGGTG GACACTGGAG ACCGCATCCG TCTTGCGGGC	1150
	GAAGGTGAAG CGGGCGAGCA TGGCGCACC GAGGCGATC TGTACGTTCA GGTTCAGGTT	1210
	AAACAGCACC CGATTTTCGA GCGTGAAGGC AACAACTGT ATTGCGAAGT CCCGATCAAC	1270
	TTCGCTATGG CGGCGCTGGG TGGCGAAATC GAAGTACCGA CCCTTGATGG TCGCGTCAAA	1330
35	CTGAAAGTGC CTGGCGAAAC CCAGACCGGT AAGCTATTCC GTATGCGCGG TAAAGGCGTC	1390
	AAGTCTGTCC GCGGTGGCGC ACAGGGTGAT TTGCTGTGCC GCGTTGTTCGT CGAAACACCG	1450
	GTAGGCCTGA ACGAAAGGCA GAAACAGCTG CTGCAAGAGC TGCAAGAAAAG CTTCCGTGGC	1510
40	CCAACCGGCG AGCACAAACAG CCCGCGCTCA AAGAGCTTCT TTGATGGTGT GAAGAAGTTT	1570
	TTTGACGACC TGACCCGCTA AGGATCCGGC TGAGCAACGA CGTGAACGCA ATGCGTTCCG	1630
45	ACGTTCAGGC TGCTAAAGAT GACGCAGCTC GTGCTAACCA GCGTCTGGAC AACATGGCTA	1690
	CTAAATACCG CAAGTAATAG TACCTGTGAA GTGAAAAATG GCGCACATTG TGCGACATTT	1750
	TTTTGTCTG CCGTTTACCG CTA CTGCTGCGTC ACGCGTAACA TATTCCCTTG CTCTGGTTCA	1810
50	CCATCTGCG CTGACTCTAC TGAAGGCGCA TTGCTGGCTG CCGGAGTTGC TCCACTGCTC	1870
	ACCGAAACCG G	1881

55

EP 1 048 732 A1

<210> 4
 <211> 133
 <212> PRT
 5 <213> E. coli

 <400> 4

 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 10 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile
 20 25 30
 Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr
 15 35 40 45
 Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys
 50 55 60
 20 Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys Glu Ile Lys Glu Ala Tyr Glu Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala
 85 90 95
 25 Phe Glu Gln Gly Gly Met Gly Gly Gly Gly Phe Gly Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Phe Ser Asp Ile Phe Gly Asp Val Phe Gly Asp Ile Phe Gly Gly Gly
 30 115 120 125
 Arg Gly Arg * *
 130
 35
 <210> 5
 <211> 1379
 <212> DNA
 40 <213> E. coli

 <220>
 <221> CDS
 <222> (392) ... (1090)
 45 <400> 5

 TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTGGATAACC AGAAGCAATA AAAAATCAAA TCGGATTTC 60
 CTATATAATC TCACTTTATC TAAGATGAAT CCCATGGAAG CATCCTGTTT TCTCTCAATT 120
 50 TTTTATCTA AAACCCAGCG TTCGATGCTT CTTTGAGCGA ACGATCAAAA ATAAGTGCCT 180
 TCCCATCAAA AAAATATTCT CAACATAAAA AACTTTGTGT AATACTTGTA ACGCTACATG 240
 55 GAGATTAACT CAATCTAGCT AGAGAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATAATGT 300

EP 1 048 732 A1

	GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT	360
5	TCACTGGAAC TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala 1 5	412
10	ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGA ATT Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile 10 15 20	460
15	CTC ACC GAG CGC CGC GTG CCC TTC TCG CTG CTG CGG AGC CCG AGC TGG Leu Thr Glu Arg Arg Val Pro Phe Ser Leu Leu Arg Ser Pro Ser Trp 25 30 35	508
	GAA CCA TTC CGG GAC TGG TAC CCT GCA CAC AGC CGC CTC TTC GAT CAA Glu Pro Phe Arg Asp Trp Tyr Pro Ala His Ser Arg Leu Phe Asp Gln 40 45 50 55	556
20	GCT TTC GGG GTG CCC CGG TTG CCC GAT GAG TGG TCG CAG TGG TTC AGC Ala Phe Gly Val Pro Arg Leu Pro Asp Glu Trp Ser Gln Trp Phe Ser 60 65 70	604
25	GCC GCT GGG TGG CCC GGA TAC GTG CGC CCG CTG CCC GCC GCG ACC GCC Ala Ala Gly Trp Pro Gly Tyr Val Arg Pro Leu Pro Ala Ala Thr Ala 75 80 85	652
30	GAG GGC CCC GCG GCG GTG ACC CTG GCC GCA CCA GCC TTC AGC CGA GCG Glu Gly Pro Ala Ala Val Thr Leu Ala Ala Pro Ala Phe Ser Arg Ala 90 95 100	700
35	CTC AAC CGA CAG CTC AGC AGC GGG GTC TCG GAG ATC CGA CAG ACG GCT Leu Asn Arg Gln Leu Ser Ser Gly Val Ser Glu Ile Arg Gln Thr Ala 105 110 115	748
	GAT CGC TGG CGC GTG TCC CTG GAC GTC AAC CAC TTC GCT CCG GAG GAG Asp Arg Trp Arg Val Ser Leu Asp Val Asn His Phe Ala Pro Glu Glu 120 125 130 135	796
40	CTC ACA GTG AAG ACC AAG GAA GGC GTG GTG GAG ATC ACT GGC AAG CAC Leu Thr Val Lys Thr Lys Glu Gly Val Val Glu Ile Thr Gly Lys His 140 145 150	844
45	GAA GAA AGG CAG GAC GAA CAT GGC TAC ATC TCT CGG TGC TTC ACC CGG Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Gly Tyr Ile Ser Arg Cys Phe Thr Arg 155 160 165	892
50	AAA TAC ACG CTC CCT CCA GGT GTG GAC CCC ACC CTA GTG TCC TCT TCC Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Gly Val Asp Pro Thr Leu Val Ser Ser Ser 170 175 180	940
55	CTA TCC CCT GAG GGC ACA CTT ACC GTG GAG GCT CCG TTG CCC AAA CCA Leu Ser Pro Glu Gly Thr Leu Thr Val Glu Ala Pro Leu Pro Lys Ala 185 190 195	988

EP 1 048 732 A1

GTC ACG CAG TCA GCG GAG ATC ACC ATT CCG GTT ACT TTC GAG GCC CGC 1036
 Val Thr Gln Ser Ala Glu Ile Thr Ile Pro Val Thr Phe Glu Ala Arg
 200 205 210 215
 5
 GCC CAA ATT GGG GGC CCA GAA GCT GGG AAG TCT GAA CAG TCT GGA GCC 1084
 Ala Gln Ile Gly Gly Pro Glu Ala Gly Lys Ser Glu Gln Ser Gly Ala
 220 225 230
 10
 AAG TAG GATCCGGCTG AGCAACGACG TGAACGCAAT GCGTTCCGAC GTTCAGGCTG 1140
 Lys *
 15
 CTAACATGA CGCAGCTCGT GCTAACCAGC GTCTGGACAA CATGGCTACT AAATACCGCA 1200
 AGTAATAGTA CCTGTGAAGT GAAAAATGGC GCACATTGTG CGACATTTTT TTTGTCTGCC 1260
 GTTTACCGCT ACTGCGTCAC GCGTAACATA TTCCCTTGCT CTGGITCACC ATTCTGCGCT 1320
 20
 GACTCTACTG AAGGCGCATT GCTGGCTGCG GGAGTTGCTC CACTGCTCAC CGAAACCGG 1379
 25
 <210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> E coli
 <400> 6
 30
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile Leu Thr Glu Arg Arg Val Pro Phe Ser
 20 25 30
 35
 Leu Leu Arg Ser Pro Ser Trp Glu Pro Phe Arg Asp Trp Tyr Pro Ala
 35 40 45
 40
 His Ser Arg Leu Phe Asp Gln Ala Phe Gly Val Pro Arg Leu Pro Asp
 50 55 60
 Glu Trp Ser Gln Trp Phe Ser Ala Ala Gly Trp Pro Gly Tyr Val Arg
 65 70 75 80
 45
 Pro Leu Pro Ala Ala Thr Ala Glu Gly Pro Ala Ala Val Thr Leu Ala
 85 90 95
 Ala Pro Ala Phe Ser Arg Ala Leu Asn Arg Gln Leu Ser Ser Gly Val
 100 105 110
 50
 Ser Glu Ile Arg Gln Thr Ala Asp Arg Trp Arg Val Ser Leu Asp Val
 115 120 125
 Asn His Phe Ala Pro Glu Glu Leu Thr Val Lys Thr Lys Glu Gly Val
 130 135 140
 55

EP 1 048 732 A1

Val Glu Ile Thr Gly Lys His Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Gly Tyr
145 150 155 160

5 Ile Ser Arg Cys Phe Thr Arg Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Gly Val Asp
165 170 175

Pro Thr Leu Val Ser Ser Ser Leu Ser Pro Glu Gly Thr Leu Thr Val
180 185 190

10 Glu Ala Pro Leu Pro Lys Ala Val Thr Gln Ser Ala Glu Ile Thr Ile
195 200 205

Pro Val Thr Phe Glu Ala Arg Ala Gln Ile Gly Gly Pro Glu Ala Gly
210 215 220

15 Lys Ser Glu Gln Ser Gly Ala Lys *

225 230

20 <210> 7
<211> 1256
<212> DNA
<213> E. coli

25 <220> --
<221> CDS
<222> (199)...(969)

<400> 7

30 GATCTGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA 60

CAATTTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTTGCAATG CAAATTCTAT 120

35 TTCAAGGAGA CAGTCATAAT GAAATACCTA TTGCCTACGG CAGCCGCTGG ATTGTTATTA 180

CTCGCGGCCC AGCCGGCC ATG GCC GAG GTC AAG CTG CAG GAG TCT GGG GGA 231
Met Ala Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly
1 5 10

40 GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CGG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT 279
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
15 20 25

45 GGA TTC ACT TTC AGT AGC TTT GGA ATG CAC TGG GTT CGT CAG GCT CCA 327
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
30 35 40

GAG AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCA TAT ATT AGT AGT GGC AGT AGT ACC 375
Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr
45 50 55

55 ATC TAC TAT GCA GAC ACA GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC 423
Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
60 65 70 75

EP 1 048 732 A1

	AAT CCC AAG AAC ACC CTG TTC CTG CAA ATG ACC AGT CTA AGG TCT GAG	471
	Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu	
	80 85 90	
5	GAC ACG GCC ATG TAT TAC TGC GCA AGA GAT TAC GGG GCT TAT TGG GGC	519
	Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Ala Tyr Trp Gly	
	95 100 105	
10	CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA	567
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	110 115 120	
15	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA	615
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro	
	125 130 135	
20	GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT	663
	Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser	
	140 145 150 155	
	GCC AGT TCA AGT GTA AGG TAC ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAG TCA GGC	711
	Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly	
	160 165 170	
25	ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG TCT TCT GGA	759
	Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly	
	175 180 185	
30	GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC	807
	Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu	
	190 195 200	
35	ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG	855
	Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln	
	205 210 215	
40	CAG TGG AGT AGT AAT CCA CTC ACT TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG	903
	Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu	
	220 225 230 235	
45	CTG AAA CGG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG	951
	Leu Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu	
	240 245 250	
50	AAT GGG GCC GCA TAG TAA CTGAGCAACG ACGTGAACGC AATGCGTTCC	999
	Asn Gly Ala Ala * *	
	255	
55	GACGTTTCAGG CTGCTAAAGA TGACGCAGCT CGTGCTAACC AGCGTCTGGA CAACATGGCT	1059
	ACTAAATACC GCAAGTAATA GTACCTGTGA AGTGAAAAAT GGCGCACATT GTGCGACATT	1119
	TTTTTGCTCT GCCGTTTACC GCTACTGCGT CACGCGTAAC ATATTCCTT GCTCTGTTCT	1179
	ACCATCTCTGC GCTGACTCTA CTGAAGGCGC ATTGCTGGCT GCGGGAGTTG CTCCACTGCT	1239

CACCGAAACC GGAGATC

1256

5
 <210> 8
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> E. coli

10
 <400> 8

Met Ala Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

15
 Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

20
 Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

25
 Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

30
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

35
 Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
 130 135 140

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 145 150 155 160

40
 Arg Tyr Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
 165 170 175

45
 Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
 180 185 190

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
 195 200 205

50
 Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
 210 215 220

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Ala
 225 230 235 240

55

EP 1 048 732 A1

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala *
 245 250 255

5

*

<210> 9
 <211> 1137
 <212> DNA
 <213> E. coli

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1137)

15

<400> 9

20

ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

25

GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GCT TAC CAA GGA AAC AGT GAC TGC TAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Tyr Gln Gly Asn Ser Asp Cys Tyr
 20 25 30

30

TTT GGG AAT GGG TCA GCC TAC CGT GGC ACG CAC AGC CTC ACC GAG TCG 144
 Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser
 35 40 45

GGT GCC TCC TGC CTC CCG TGG AAT TCC ATG ATC CTG ATA GGC AAG GTT 192
 Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val
 50 55 60

35

TAC ACA GCA CAG AAC CCC AGT GCC CAG GCA CTG GGC CTG GGC AAA CAT 240
 Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His
 65 70 75 80

40

AAT TAC TGC CGG AAT CCT GAT GGG GAT GCC AAG CCC TGG TGC CAC GTG 288
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val
 85 90 95

45

CTG ACG AAC CGC AGG CTG ACG TGG GAG TAC TGT GAT GTG CCC TCC TGC 336
 Leu Thr Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys
 100 105 110

TCC ACC TGC GGC CTG AGA CAG TAC AGC CAG CCT CAG TTT CGC ATC AAA 384
 Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys
 115 120 125

50

GGA GGG CTC TTC GCC GAC ATC GCC TCC CAC CCC TGG CAG GCT GCC ATC 432
 Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile
 130 135 140

55

EP 1 048 732 A1

	TTT GCC AAG CAC AGG AGG TCG CCC GGA GAG CGG TTC CTG TGC GGG GGC	480
	Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly	
	145 150 155 160	
5	ATA CTC ATC AGC TCC TGC TGG ATT CTC TCT GCC GCC CAC TGC TTC CAG	528
	Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln	
	165 170 175	
10	GAG ACG TTT CCG CCC CAC CAC CTG ACG GTG ATC TTG GGC AGA ACA TAC	576
	Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr	
	180 185 190	
15	CGG GTG GTC CCT GGC GAG GAG GAG CAG AAA TTT GAA GTC GAA AAA TAC	624
	Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr	
	195 200 205	
20	ATT GTC CAT AAG GAA TTC GAT GAT GAC ACT TAC GAC AAT GAC ATT GCG	672
	Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala	
	210 215 220	
25	CTG CTG CAG CTG AAA TCG GAT TCG TCC CGC TGT GCC CAG GAG AGC AGC	720
	Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser	
	225 230 235 240	
30	GTG GTC CGC ACT GTG TGC CTT CCC CCG GCG GAC CTG CAG CTG CCG GAC	768
	Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp	
	245 250 255	
35	TGG ACG GAG TGT GAG CTC TCC GGC TAC GGC AAG CAT GAG GCC TTG TCT	816
	Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser	
	260 265 270	
40	CCT TTC TAT TCG GAG CGG CTG AAG GAG GCT CAT GTC AGA CTG TAC CCA	864
	Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro	
	275 280 285	
45	TCC AGC CGC TGC ACA TCA CAA CAT TTA CTT AAC AGA ACA GTC ACC GAC	912
	Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp	
	290 295 300	
50	AAC ATG CTG TGT GCT GGA GAC ACT CGG AGC GGC GGG CCC CAG GCA AAC	960
	Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn	
	305 310 315 320	
55	TTG CAC GAC GCC TGC CAG GGC GAT TCG GGA GGC CCC CTG GTG TGT CTG	1008
	Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu	
	325 330 335	
60	AAC GAT GGC CGC ATG ACT TTG GTG GGC ATC ATC AGC TGG GGC CTG GGC	1056
	Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly	
	340 345 350	
65	TGT GGA CAG AAG GAT GTC CCG GGT GTG TAC ACC AAG GTT ACC AAC TAC	1104
	Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr	
	355 360 365	

CTA GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA
 Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro *
 370 375

1137

<210> 10
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 10

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Tyr Gln Gly Asn Ser Asp Cys Tyr
 20 25 30

Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser
 35 40 45

Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val
 50 55 60

Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His
 65 70 75 80

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val
 85 90 95

Leu Thr Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys
 100 105 110

Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys
 115 120 125

Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile
 130 135 140

Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly
 145 150 155 160

Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln
 165 170 175

Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr
 180 185 190

Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr
 195 200 205

Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala
 210 215 220

EP 1 048 732 A1

Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser
 225 230 235 240
 5 Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp
 245 250 255
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser
 260 265 270
 10 Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro
 275 280 285
 Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp
 290 295 300
 15 Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn
 305 310 315 320
 Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu
 325 330 335
 20 Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly
 340 345 350
 Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr
 355 360 365
 25 Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro *
 370 375
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen, natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptids, enthaltend zwei oder mehrere über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine,
 durch Kultivierung prokaryontischer Zellen,
 a) wobei die genannten prokaryontischen Zellen einen Expressionsvektor enthalten, der für das genannte Polypeptid, das am N-Terminus eine prokaryontische Signalsequenz enthält, codiert,
 b) unter Bedingungen, bei denen das Polypeptid in das Periplasma oder das Medium sekretiert wird,
 c) Abspaltung der Signalsequenz und Isolierung des Polypeptids aus dem Periplasma oder dem Medium,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Kultivierung in Gegenwart von Arginin oder einer Verbindung der allgemeinen Formel I

$$R_2-CO-NRR_1 \quad (I),$$
 erfolgt, wobei R und R_1 Wasserstoff oder eine gesättigte oder ungesättigte verzweigte oder unverzweigte C_1-C_4 -Alkylkette und R_2 Wasserstoff, NHR_1 oder eine gesättigte oder ungesättigte verzweigte oder unverzweigte C_1-C_3 -Alkylkette darstellen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Arginin als Hydrochlorid oder als andere titrierte Form verwendet wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß dem Nährmedium ein reduzierendes Thiolreagenz zugesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als reduzierendes Thiolreagenz Glutathion (GSH) verwendet wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalsequenz aus gramnegativen Bakterien stammt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die prokaryontische Zelle einen weiteren Expressionsvektor, der für ein molekulares Chaperon codiert, enthält.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das molekulare Chaperon DNAJ aus E. coli oder HSP25 ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die für das molekulare Chaperon codierende rekombinante DNA in operativer Verknüpfung mit einem DNA-Fragment steht, das ein Signalpeptid zum Durchdringen der inneren bakteriellen Membran codiert.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sich die für das sekretierte molekulare Chaperon und/oder für das sekretierte Protein codierende DNA unter Kontrolle eines induzierbaren Expressions-signals befindet.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid ein Antikörper, Antikörperfragment, Interferon, Proteinormon oder eine Protease ist.

Fig. 1

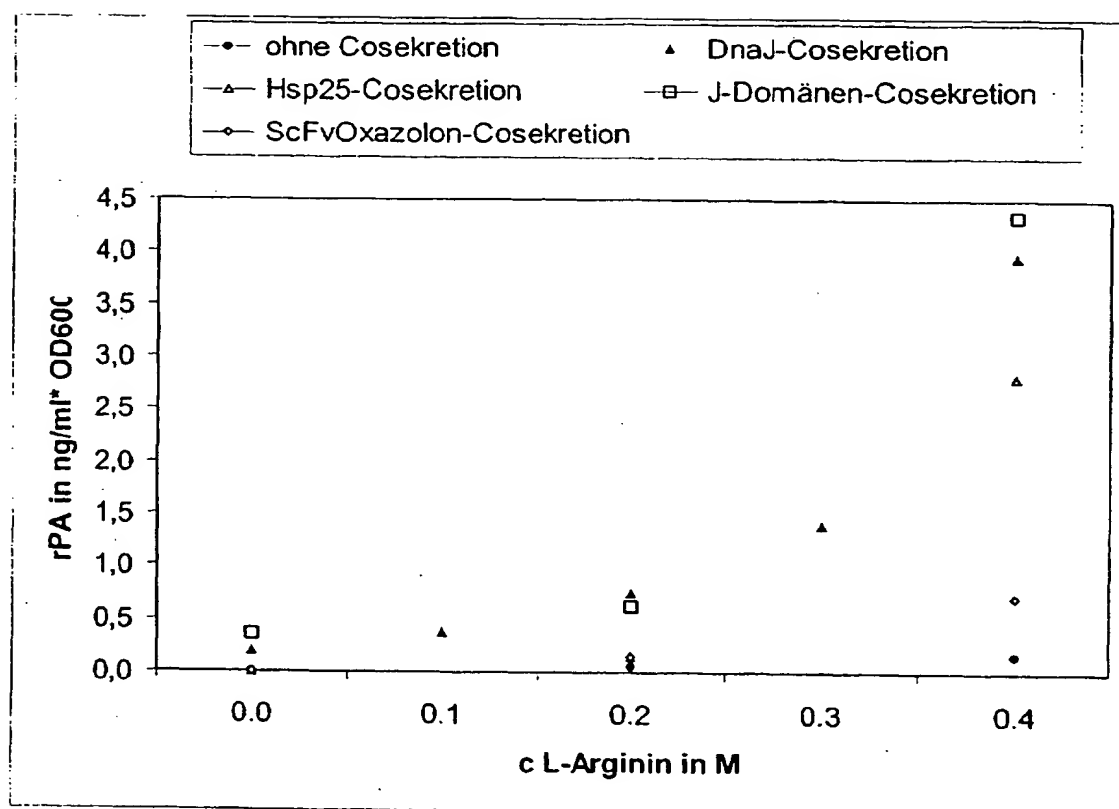


Fig. 2

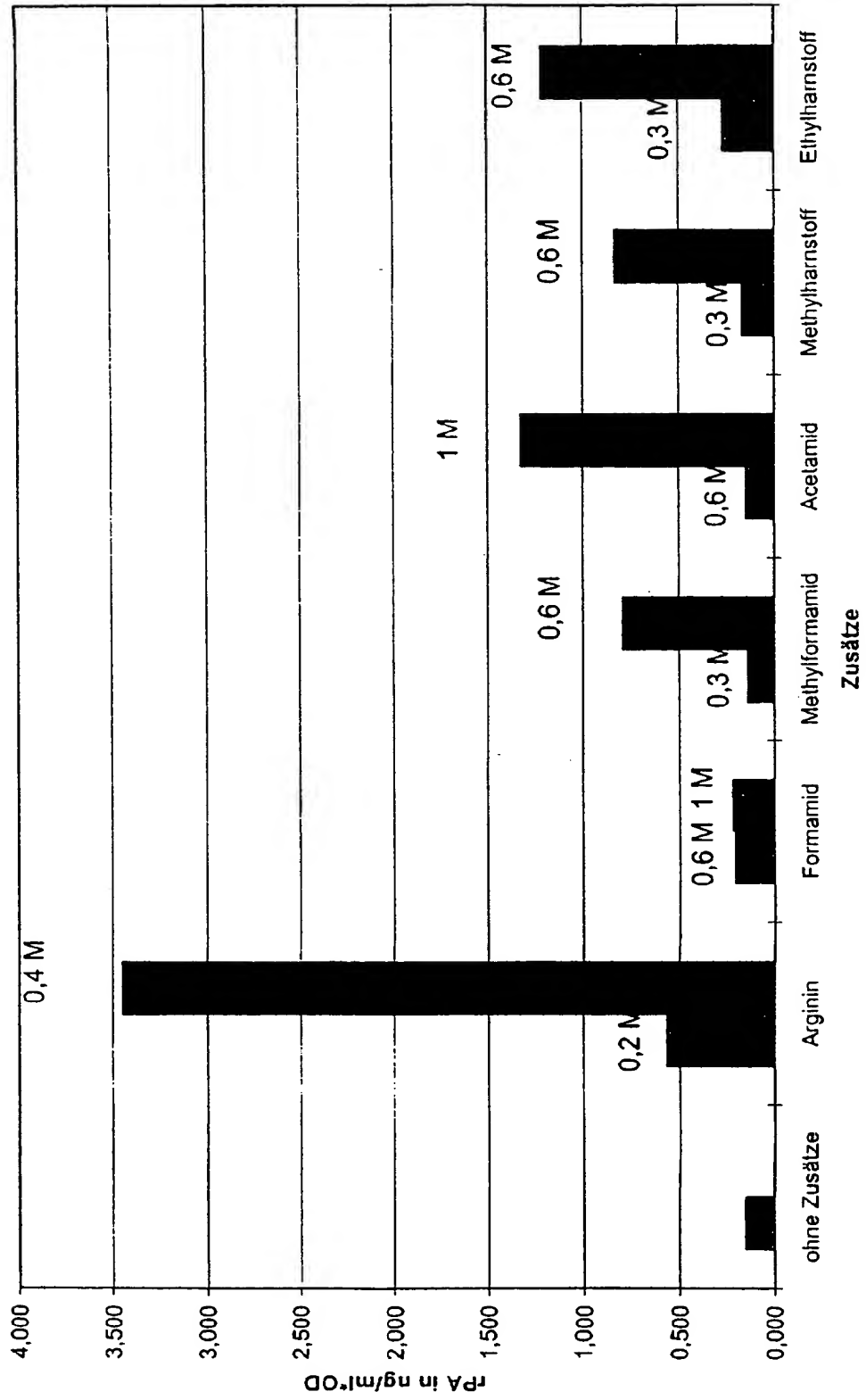


Fig. 3

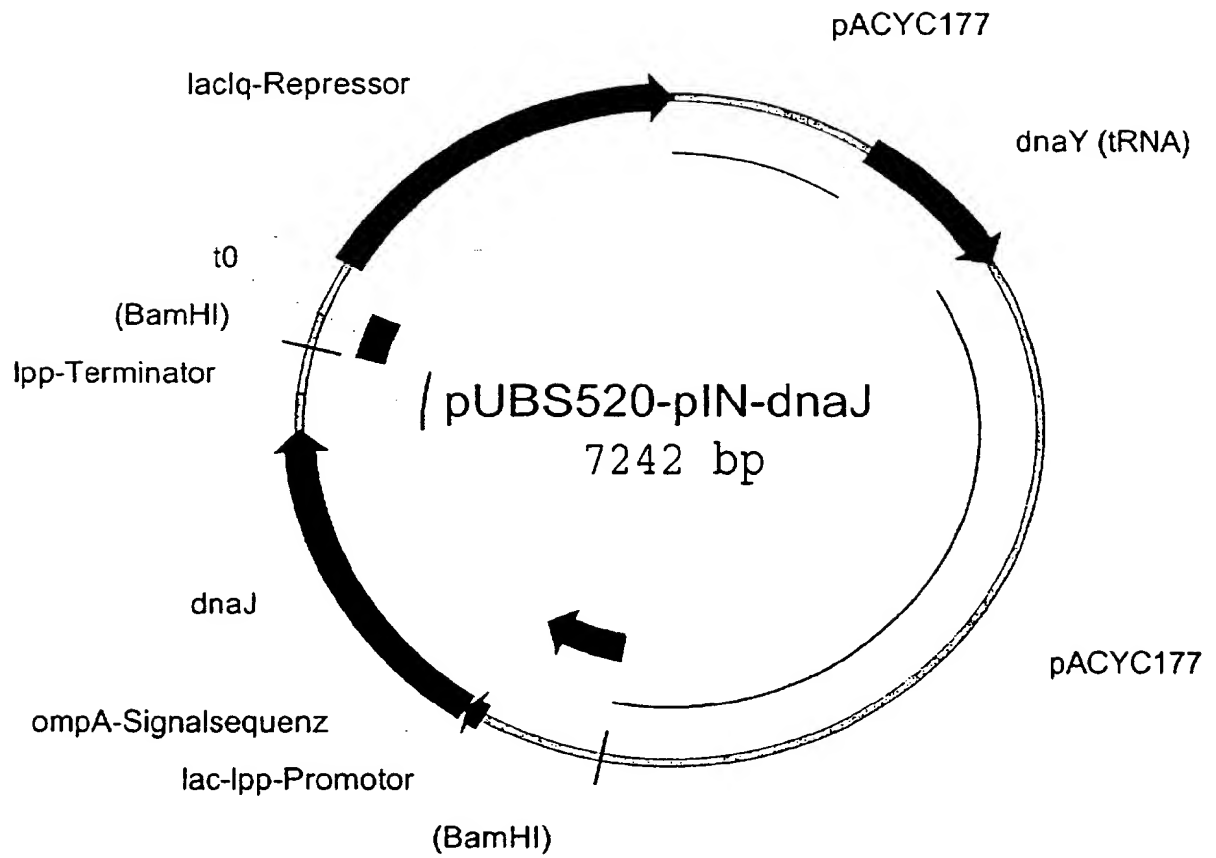


Fig. 4

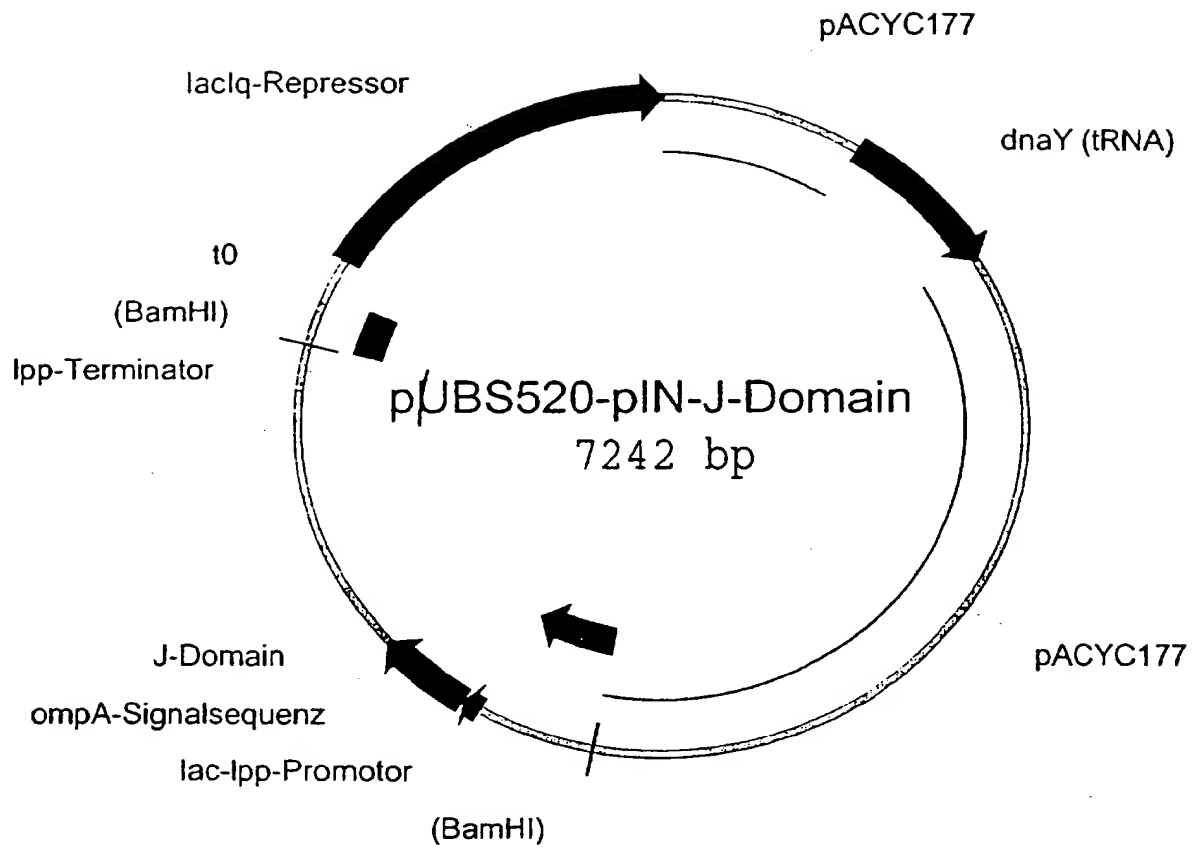


Fig. 5

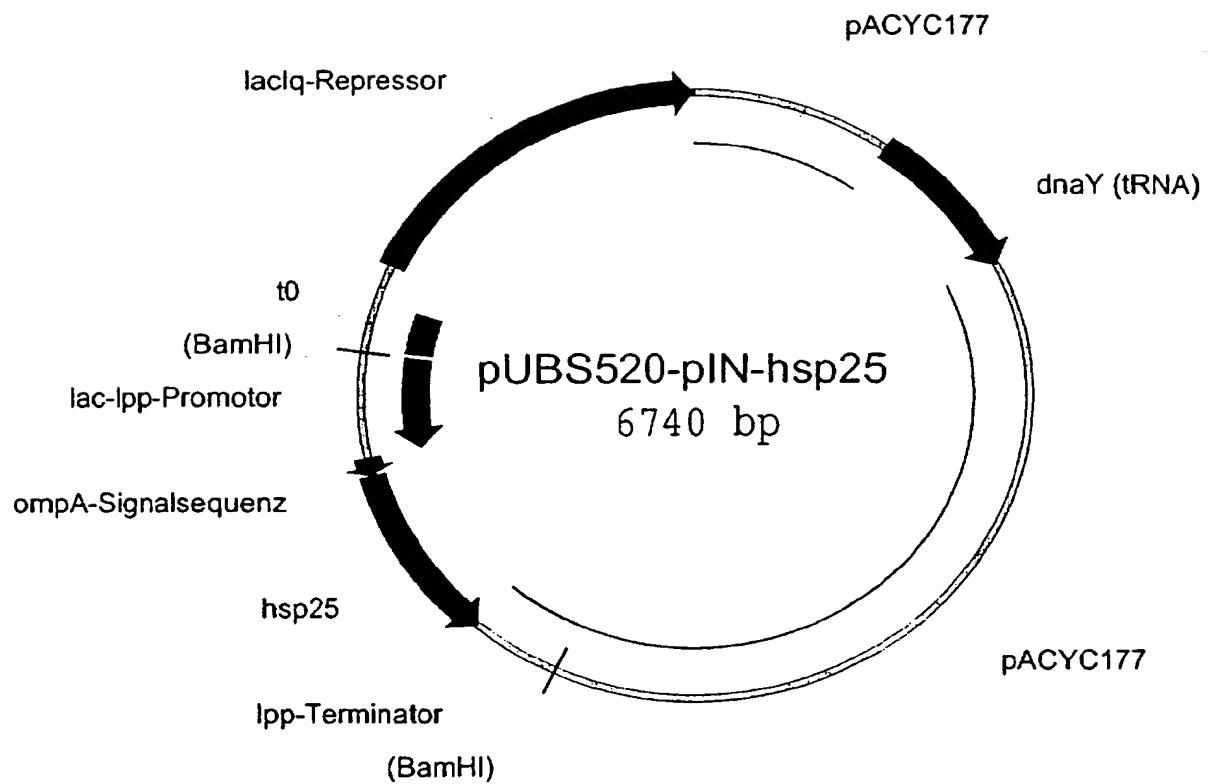


Fig. 6

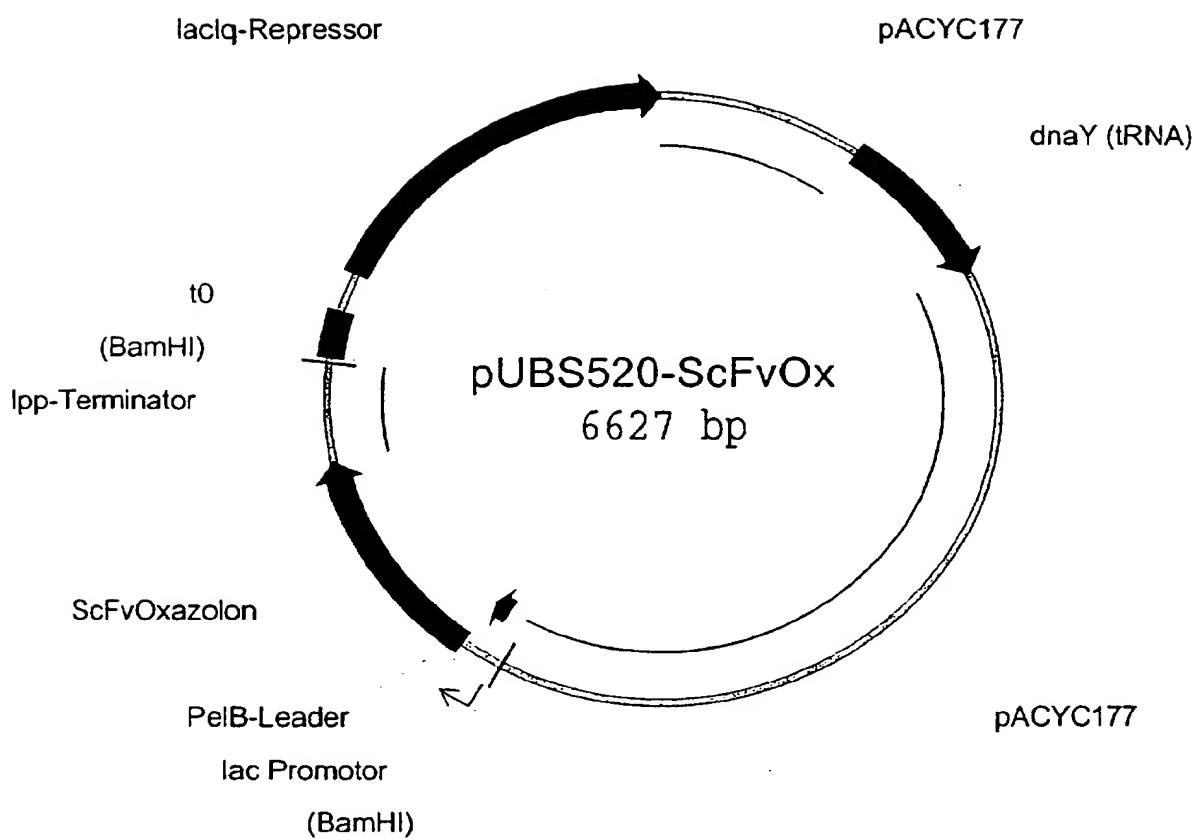


Fig. 7

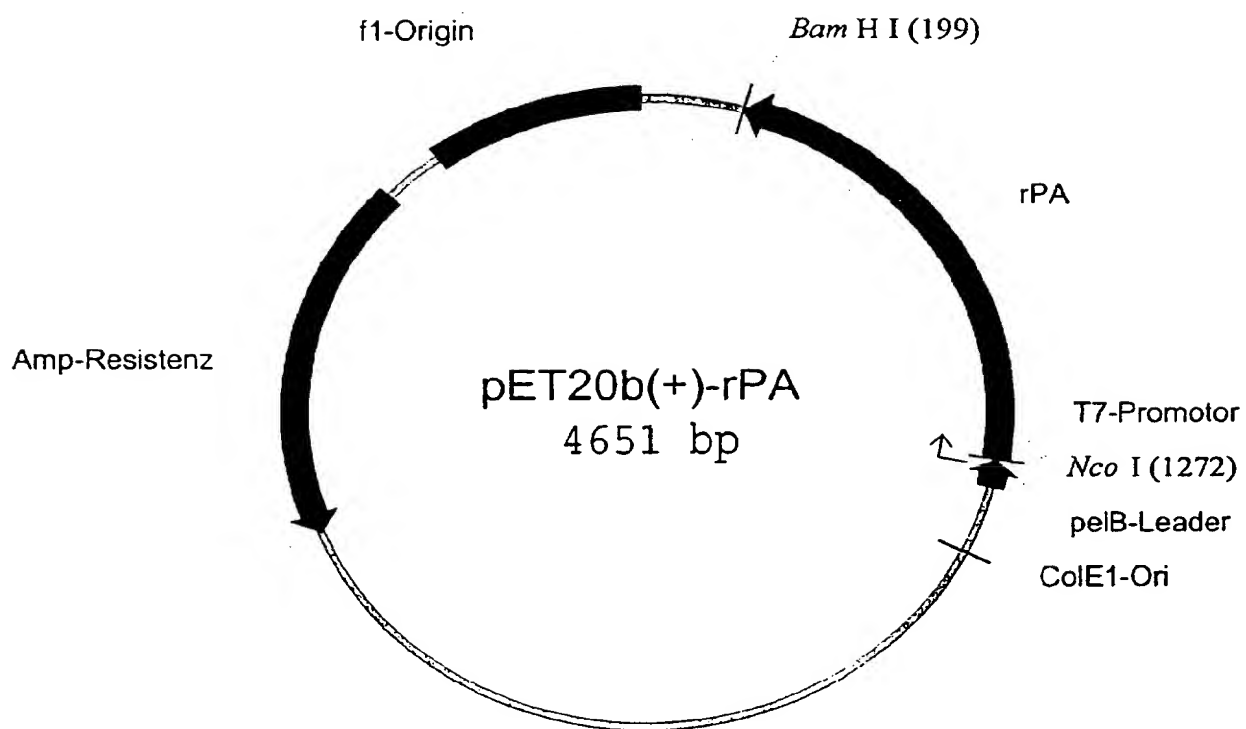


Fig. 8

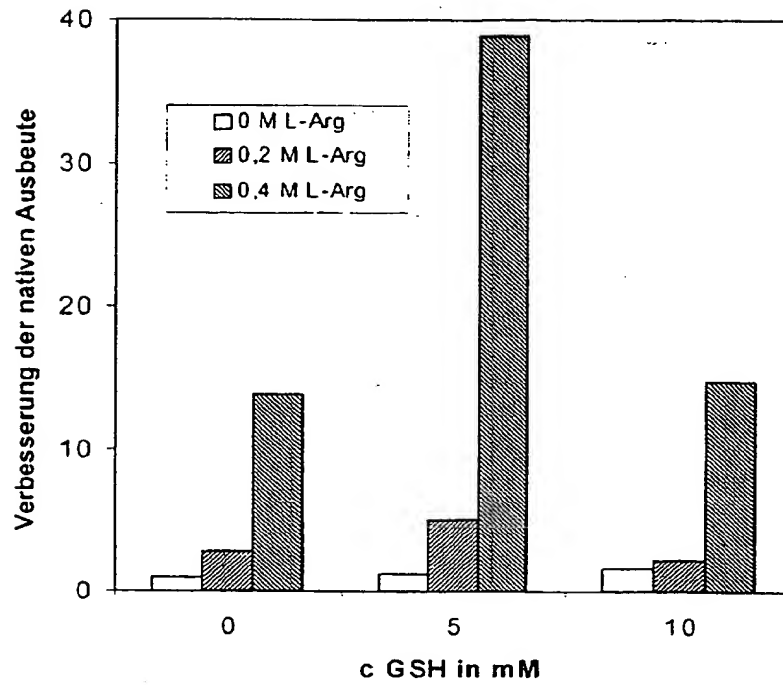
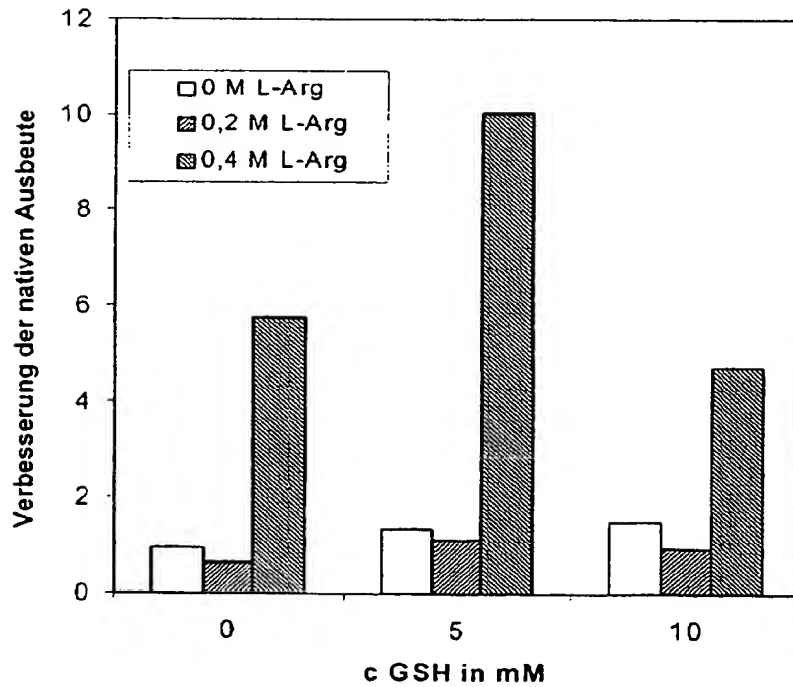


Fig. 9





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 10 7412

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG
X	WO 98 18946 A (GENENTECH INC) 7. Mai 1998 (1998-05-07)	1, 3, 5, 6, 8-10	C12N15/58 C12N15/62
Y	* das ganze Dokument *	2, 4, 7	C12N15/31 C12N9/72
X	WO 96 14422 A (GENENTECH INC) 17. Mai 1996 (1996-05-17)	1, 3, 5, 6, 8-10	C07K14/245 C07K1/113
Y	* das ganze Dokument *	2, 4, 7	C12N1/20 C12N15/70
Y	EP 0 725 140 A (SANOFI SA) 7. August 1996 (1996-08-07)	1, 2, 10	C12P21/02
	* das ganze Dokument *		
Y	US 4 757 013 A (INOUE MASAYORI ET AL) 12. Juli 1988 (1988-07-12)	1, 2, 10	
	* Spalte 49, Zeile 7 - Spalte 62, Zeile 64 *		
Y	EP 0 219 874 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 29. April 1987 (1987-04-29)	2, 4	
	* das ganze Dokument *		
Y	K.-ICHI YOKOYAMA ET AL.: "Overproduction of DnaJ in Escherichia coli improves in vivo solubility of the recombinant Fish-derived transglutaminase" BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, Bd. 62, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 1205-1210, XP002114992 TOKYO JP	7	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE C12N C07K C12P
	* das ganze Dokument *		
Y	EP 0 885 967 A (HSP RESEARCH INST INC) 23. Dezember 1998 (1998-12-23)	7	
	* das ganze Dokument *		
A	WO 89 06283 A (INGENE INTERNATIONAL GENETIC E) 13. Juli 1989 (1989-07-13)	1-10	
	* das ganze Dokument *		
	--- -/-		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10. September 1999	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTE DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03 82 (PUC03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 10 7412

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG
A	EP 0 774 512 A (IMANAKA TADAYUKI) 21. Mai 1997 (1997-05-21) * das ganze Dokument *	1-10	
A	EP 0 510 658 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28. Oktober 1992 (1992-10-28) * das ganze Dokument *	1-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10. September 1999	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03/92 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 10 7412

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

10-09-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9818946 A	07-05-1998	US 5789199 A	04-08-1998
		AU 4816397 A	22-05-1998
WO 9614422 A	17-05-1996	US 5639635 A	17-06-1997
		CA 2203373 A	17-05-1996
		EP 0786009 A	30-07-1997
		JP 10508203 T	18-08-1998
		US 5789199 A	04-08-1998
EP 0725140 A	07-08-1996	FR 2729972 A	02-08-1996
		AU 700509 B	07-01-1999
		AU 4224496 A	08-08-1996
		BR 9600270 A	23-12-1997
		CA 2168382 A	01-08-1996
		CN 1142502 A	12-02-1997
		CZ 9600290 A	14-08-1996
		EA 960001 A	01-07-1996
		FI 960427 A	01-08-1996
		HU 9600209 A	28-05-1997
		JP 8242879 A	24-09-1996
		NO 960396 A	01-08-1996
		NZ 280919 A	27-07-1997
		PL 312543 A	05-08-1996
		SK 10696 A	04-09-1996
		US 5700665 A	23-12-1997
		US 5856142 A	05-01-1999
		ZA 9600734 A	16-08-1996
US 4757013 A	12-07-1988	US 4643969 A	17-02-1987
EP 0219874 A	29-04-1987	DE 3537708 A	23-04-1987
		AT 98648 T	15-01-1994
		AT 131489 T	15-12-1995
		AU 607083 B	21-02-1991
		AU 4132189 A	04-01-1990
		AU 590029 B	26-10-1989
		AU 6599386 A	19-05-1987
		CA 1329157 A	03-05-1994
		CZ 8607526 A	17-01-1996
		DE 3650449 D	25-01-1996
		DE 3689404 D	27-01-1994
		DK 320387 A	23-06-1987
		WO 8702673 A	07-05-1987
		EP 0253823 A	27-01-1988
		EP 0393725 A	24-10-1990
		ES 2061434 T	16-12-1994

EPO FORM P0451

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 10 7412

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am 10-09-1999.
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

10-09-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0219874 A		ES 2020498 T	01-04-1996
		FI 872753 A,B,	22-06-1987
		FI 933868 A,B,	03-09-1993
		GR 92300062 T	31-08-1992
		GR 3018410 T	31-03-1996
		HK 153496 A	16-08-1996
		HK 153596 A	16-08-1996
		HR 921075 A	30-06-1995
		IE 62634 B	22-02-1995
		JP 2117325 C	06-12-1996
		JP 4218387 A	07-08-1992
		JP 8024594 B	13-03-1996
		JP 7028745 B	05-04-1995
		JP 62502895 T	19-11-1987
		LV 5289 A	10-10-1993
		PT 83609 A,B	01-11-1986
		SI 8611796 A,B	31-10-1996
		SK 752686 A	01-10-1996
		US 5453363 A	26-09-1995
		US 5593865 A	14-01-1997
		YU 179686 A	30-06-1988
EP 0885967 A	23-12-1998	JP 11009274 A	19-01-1999
		CA 2235468 A	20-12-1998
WO 8906283 A	13-07-1989	AT 140731 T	15-08-1996
		AU 2937789 A	01-08-1989
		CA 1338807 A	24-12-1996
		DE 68926882 D	29-08-1996
		DE 68926882 T	13-02-1997
		EP 0396612 A	14-11-1990
		JP 4503151 T	11-06-1992
		US 5618920 A	08-04-1997
		US 5595898 A	21-01-1997
		US 5576195 A	19-11-1996
		US 5693493 A	02-12-1997
		US 5698417 A	16-12-1997
		US 5698435 A	16-12-1997
		US 5846818 A	08-12-1998
EP 0774512 A	21-05-1997	JP 9173078 A	08-07-1997
EP 0510658 A	28-10-1992	DE 4113750 A	29-10-1992
		AT 109205 T	15-08-1994
		AU 636537 B	29-04-1993
		AU 1515992 A	19-11-1992

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 10 7412

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

10-09-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0510658 A		CA 2066370 A, C	27-10-1992
		DE 59200312 D	01-09-1994
		DK 510658 T	28-11-1994
		ES 2057944 T	16-10-1994
		FI 921838 A	27-10-1992
		IE 65792 B	29-11-1995
		JP 2033750 C	19-03-1996
		JP 5268983 A	19-10-1993
		JP 7053118 B	07-06-1995
		KR 9602869 B	27-02-1996

EPO FORM P0401

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82